

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Cellulaire et Moléculaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Axelle DAVIDAS

Thèse dirigée par **Stefan DIMITROV**

préparée au sein de L'Institut Albert Bonniot
dans l'École Doctorale **Chimie et Science du vivant**

Dissection des fonctions mitotiques de la kinase Aurora B par CALI (Chromophore-Assisted Light Inactivation)

Thèse soutenue publiquement le **lundi 12 novembre 2012**,
Devant le jury composé de :

Dr. Stefan DIMITROV

Institut Albert Bonniot, Grenoble, directeur de thèse

Pr. Hans GESEILMANN

Institut Jean Roget, Grenoble, président

Dr. Sylvie TOURNIER

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du contrôle de la prolifération
Toulouse, rapporteur

Dr. Pierre JALINOT

Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, Lyon, rapporteur

Dr. Fabien MONGELARD

Laboratoire Joliot-Curie, Lyon, examinateur

Dr. Dimitrios SKOUFIAS

Institut de Biologie Structurale, Grenoble, examinateur

Dr. Fabienne HANS

Institut de Biologie Structurale, Grenoble, invitée

*Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /
Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP*



Remerciements

Il m'appartient ici, de remercier celles et ceux qui, par leur soutien ou leur participation, de nature et de degrés variés, m'ont permis de mener à bien mes travaux de thèse et la réalisation du présent document:

- tout d'abord, Sylvie Tournier et Pierre Jalinot pour avoir accepté d'évaluer mon manuscrit, ainsi que Fabien Mongelard et Dimitrios Skoufias pour leur participation à mon jury et Hans Geiselmann pour avoir accepté de le présider
- Stefan Dimitrov pour m'avoir accueillie dans son équipe, ainsi que Fabienne Hans et, une fois encore, Dimitrios Skoufias, pour leur encadrement et leur apport scientifique tout au long de mes travaux de thèse
- Alexei Grichine, de la plate-forme microscopie, pour l'apport précieux de ses compétences techniques
- toute l'équipe, et en particulier Damien Goutte-Gattat et Yohan Roulland pour leur soutien et leur gentillesse
- enfin, Cyrille Martin, Nathalie Müller, Benoît Vettier, Meryam Beniazza et Medhi Zine pour leur aide matérielle et leur soutien moral, ainsi que tous ceux qui m'ont entourée tout au long de ma thèse.

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
APC/c : Adenomatosis Polyposis Coli/cyclosome
ATP : Acide TriPhosphate
CALI : Chromophore-Assisted Light Inactivation
CDK1 : Cyclin-Dependant Kinase 1
Cdc14 : Cell division cycle protein 14
CENPA : CENTromere Protein A
CENPE : CENTromere Protein E
CENPC : CENTromere Protein C
CHP1 : Calcineurin-like EF Hand Protein 1
CHMP4C : Charged multivesicular body protein 4C
Cdh1 : CDC20 homolog 1
CHK1 : Checkpoint kinase-1
CPC : Chromosomal Passenger Complex
DIC : Differential Interference Contrast
Ect2 : Epithelial cell transforming sequence 2
ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FITC : Fluorescein IsoThioCyanate
FRET : Förster Resonance Energy Transfert
GFP : Green Fluorescent Protein
HEC1 : Highly Expressed in Cancer 1
Incenp : INner CENTromere Protein
Ipl1 : Increase in ploidy 1
kDa : Kilo Dalton
KiF4 : Kinesin Family member 4
KMN : Knl1–Mis12–Ndc80
KO : Knock Out
KR : Killer Red
MCAK : Mitotic-Centromere-Associated Kinesin
MCC : Mitotic Checkpoint Complex
MgcRacGAP : Male germ cell Rac GTPase Activating Protein
MKLP1 : Mitotic Kinesin-Like Protein 1
MKLP2 : Mitotic Kinesin-Like Protein 1
Mst1 : Mammalian stérile 20-like kinase 1)
OCRL : OculoCerebroRenal syndrome of Lowe
Op18/Stathmin : Oncoprotein 18 Stathmin
PH : Pleckstrin Homology
Pb : Paire de base
PCR : Polymerase Chain Reaction
PLK1 : Polo-Like Kinase 1
PRC1 : Protein regulator of cytokinesis 1
SAC : Spindle Assembly Checkpoint
SVF : Sérum de Veau Fœtal
TagRFP : TagRed Fluorescent Protein

Sommaire

Chapitre I : Introduction	1
I. Les kinases mitotiques Auroras : oncogéniques?	3
I.1 Le cycle cellulaire	3
I.2 La mitose	3
I.3 Structure du chromosome mitotique	4
I.4 Les kinases mitotiques	6
a) CDK kinases	
b) PLK kinase	
c) NIMA kinases	
d) Auroras kinases	
I.5 Les kinases Auroras : oncogéniques?	11
I.6 Les inhibiteurs des Auroras	15
II. Le complexe des protéines passagères	17
II.1 Localisation particulière en mitose.	18
II.2 Présentation des différents membres	19
II.3 Activation du complexe	22
III. Implication du complexe des protéines passagères dans le déroulement de la mitose	23
III.1 Rôle du CPC en début de mitose	23
a) Centromères et kinétochores	
b) Recrutement du CPC en début de mitose	
i) Au niveau de la chromatine	
ii) Au niveau des centromères	
c) Implication dans la structure du chromosome mitotique	
d) Implication dans la formation du fuseau mitotique	
e) Implication dans la régulation du point de contrôle mitotique	
III.2 CPC et Cytodiérèse	43
a) Relocalisation CPC :	
b) Mécanisme général de la Cytokinèse :	
c) Implication des éléments régulateurs du fuseau central dans la cytokinèse	
d) Rôle d'Aurora B dans le point de contrôle de l'abscission	

Chapitre II : Matériel et Méthodes	58
I. Optogénétique	59
<i>Principe</i>	
<i>Chromophore-Assisted Light Inactivation</i>	
<i>Pseudogénétique</i>	
<i>Dispositif expérimental</i>	
<i>Photo-blanchiment</i>	
<i>Vidéo-microscopie</i>	
II. Biologie Moléculaire	63
<i>Plasmides utilisés</i>	
<i>Clonages</i>	
II. Traitements cellulaires	65
<i>Culture cellulaire</i>	
<i>Transfections</i>	
<i>Lignées stables</i>	
<i>Enrichissement en mitose</i>	
<i>Enrichissement en ponts chromatinien</i>	
III. Immunofluorescence	67
<i>Fixation</i>	
<i>Immunomarquage</i>	
<i>Observation des cellules fixées</i>	
Chapitre III : Résultats	68
Article : New insights in Aurora B's function using chromophore assisted light inactivation (CALI)	69
Résultats annexes	90
I. CALI à l'aide du laser 561 nm	91
II. CALI sur des cellules enrichies en ponts chromatinien	93

Chapitre IV : Discussion	94
I. L'optogénétique développée pour l'étude d'Aurora B en mitose : une méthode fonctionnelle	95
II. L'activité d'Aurora B est importante tout au long de la mitose	95
<i>Photo-inactivation d'Aurora B en début de mitose : mise en évidence des rôles de détection et correction des attachements non-amphitéliques.</i>	
<i>Photo-inactivation d'Aurora B en anaphase : l'activité de la kinase est importante pour une constriction viable du sillon de division.</i>	
<i>Photo-inactivation d'Aurora B en cytokinèse : Aurora B n'est pas requise pour l'abscission à l'issue d'une mitose correcte.</i>	
III. L'activité d'Aurora B n'est pas impliquée dans la dynamique de localisation du CPC	98
IV. Aurora B possède aussi un rôle structural au sein du CPC	100
V. Réflexion sur l'Optogénétique	101
<i>Limites de la technologie : activité résiduelle d'Aurora B? Toxicité pour les cellules?</i>	
<i>Etat photo-inactivé d'Aurora B ?</i>	
<i>Photo-inactivation à l'aide du laser ?</i>	
Perspectives	103
Conclusion	105
Annexe : Liste des substrats d'Aurora B	106
Bibliographie	107

Chapitre I : Introduction

I. Les kinases mitotiques Auroras

- I.1 Le cycle cellulaire
- I.2 La mitose
- I.3 Structure du chromosome mitotique
- I.4 Les kinases mitotiques
 - a) CDK kinase
 - b) PLK kinases
 - c) NIMA-related kinases
 - d) Auroras kinases
- I.5 Les kinases Auroras : oncogéniques?
- I.6 Les inhibiteurs des Auroras

II. Le complexe des protéines passagères

- II.1 Localisation particulière en mitose
- II.2 Présentation des différents membres
- II.3 Activation du complexe

III. Implication du complexe des protéines passagères dans le déroulement de la mitose

- III.1 Rôle du CPC en début de mitose
 - a) Centromères et kinétochores
 - b) Recrutement du CPC en début de mitose
 - i) Au niveau des bras chromosomiques
 - ii) Au niveau des centromères
 - c) Implication dans la structure du chromosome mitotique
 - d) Implication dans la formation du fuseau mitotique
 - e) Implication dans la régulation du point de contrôle mitotique
- III.2 CPC et Cytodiérèse
 - a) Relocalisation CPC
 - b) Mécanisme général de la Cytokinèse
 - c) Implication des éléments régulateurs du fuseau central dans la cytokinèse
 - d) Rôle d'Aurora B dans le point de contrôle de l'abscission

Bilan

Objectifs de thèse

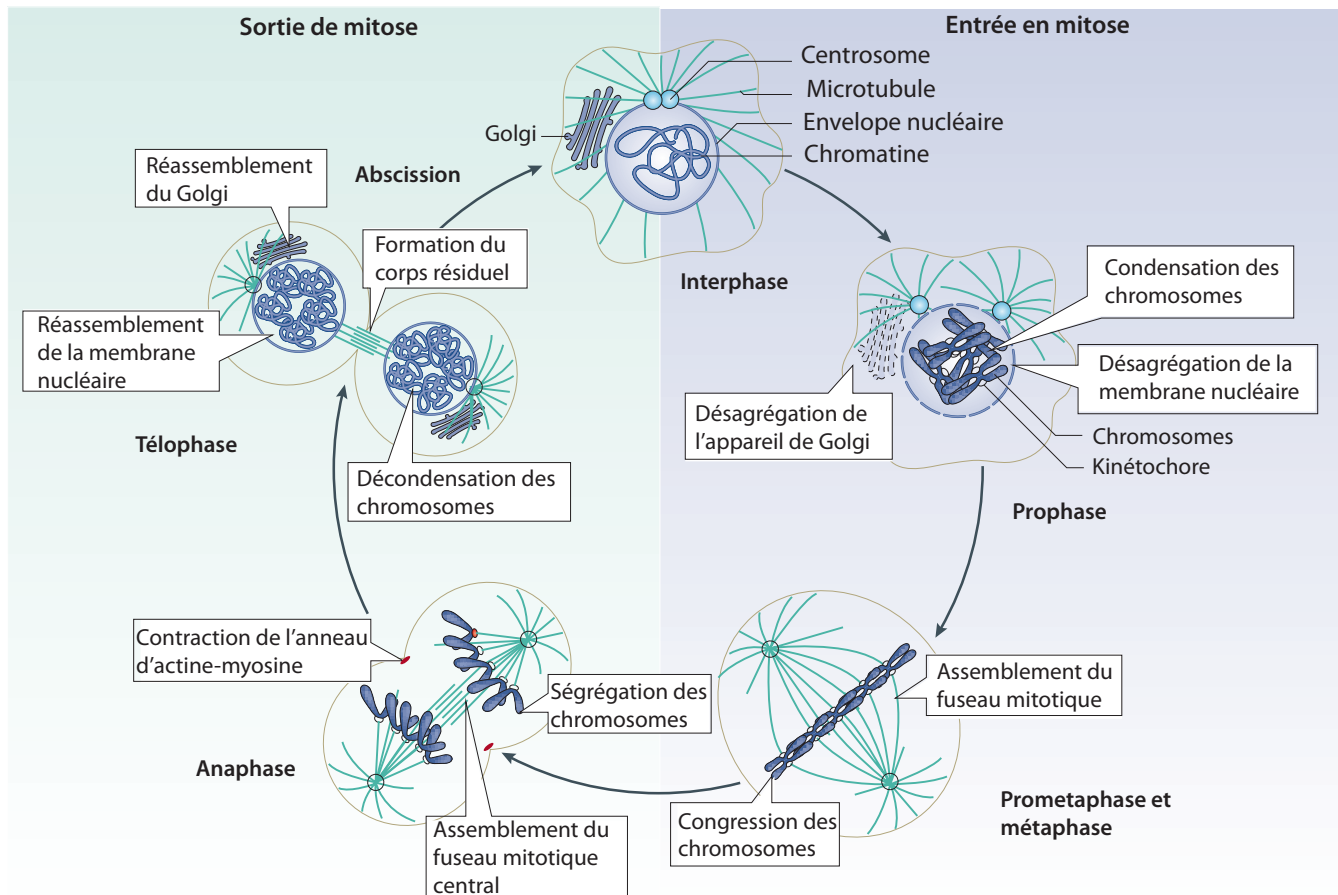


Figure I.1 : Schéma représentant les grandes étapes de la mitose. L'entrée en mitose est marquée par la désagrégation de la membrane nucléaire. La première phase est la prophase, au cours de laquelle les chromosomes se condensent sous forme de chromosome mitotique, en fin de prophase la membrane nucléaire et l'appareil de Golgi sont entièrement désagregés et la cellule arrondie. En prometaphase et métaphase, le fuseau mitotique, composés de microtubules, se met en place à partir des deux centrosomes. Cela permet la congression des chromosomes mitotiques, composés de deux chromatides sœurs, sur la plaque équatoriale. En anaphase, les chromatides sœurs se séparent et ségrégent de part et d'autres des pôles cellulaires. L'anneau contractile d'actine-myosine et le fuseau mitotique central s'assemblent puis se contractent. En télophase, la membrane nucléaire et l'appareil de Golgi se reforment, le corps résiduel, issu des éléments du fuseau central, se forme. Puis l'abscission, aboutissant à la formation de deux cellules filles indépendantes, marque la sortie de mitose. (D'après Wurzenberger and Gerlich, 2011).

I. Les kinases mitotiques Aurora

I.1 Le cycle cellulaire

Chez les Eucaryotes, la division cellulaire se réalise en différentes étapes ; c'est le cycle cellulaire. Deux grands événements sont importants : la réplication du matériel génétique et des organites, et la division en elle-même. Le cycle se divise donc en deux phases distinctes : l'interphase et la mitose (ou phase M). L'interphase débute par la phase G1, étape de préparation à la phase S au cours de laquelle l'ADN et les différents organites sont dupliqués, puis se poursuit par la phase G2. Différents points de contrôle sont mis en place pour éviter les erreurs de duplication. En fin de phase G2, qui prépare pour la phase M, la membrane nucléaire se dissocie et marque l'entrée en mitose. Tout au long du cycle, la taille de la cellule et l'ensemble de son matériel cellulaire augmentent. La plupart des cellules adultes sont quiescentes et n'entrent pas en cycle cellulaire.

I.2 La mitose

La mitose permet la répartition équilibrée des deux lots de chromatides sœurs au sein des deux futures cellules filles, ainsi que la séparation physique de celles-ci. Elle est composée de la prophase, prométaphase, métaphase, anaphase, télophase et de la phase d'abscission (Barr et al., 2004) (voir Figure I.1). Elle débute après rupture de la membrane nucléaire. L'entrée en mitose est déclenchée par l'activité de la kinase CDK1 (Cyclin Dependent Kinase 1) associée à la cycline B. Celle-ci phosphoryle un grand nombre de protéines au cours de la transition entre les phases G2 et M. Suite à cette phosphorylation massive, des changements se produisent au niveau cytoplasmique : le Golgi se désassemble, la membrane nucléaire se désagrège (Malumbres, 2011).

Au cours de la prophase, les chromosomes se condensent. Ils sont composés de deux chromatides sœurs reliées entre elles par des cohésines. Celles-ci sont tout d'abord retrouvées le long des chromosomes, puis au fur et à mesure dégradées pour ne plus être que centromériques. Les centrosomes, dupliqués en interphase, migrent à chacun des deux des pôles opposés de la cellule. En prométaphase, les microtubules sont nucléés à partir des centrosomes et des chromosomes, pour former le fuseau mitotique bipolaire. Celui-ci, en attachant des microtubules aux centromères des chromosomes,

permet leur congression sur la plaque équatoriale. Après clivage de leur cohésines centromériques, les deux lots de chromatides sœurs, alors correctement alignés sur la plaque équatoriale, sont ségrégés de part et d'autre des pôles opposés de la cellule ; c'est l'anaphase. La naissance du fuseau central de microtubules permet l'élargissement de la cellule et la mise en place d'un anneau contractile d'actine-myosine. Sa contraction forme le sillon de division. La cytokinèse, qui consiste en la séparation physique des cellules, a commencé. Au cours de la télophase, les chromosomes dépourvus de microtubules se décondensent, la membrane nucléaire et l'appareil de Golgi se reforment. Les cellules, alors reliées par le corps résiduel, se séparent au cours de l'abscission, qui marque la fin de la mitose. (Barr et al., 2004)

I.3 Structure du chromosome mitotique :

En début de prophase, les chromosomes, alors composés de deux chromatides sœurs, se condensent sous forme de chromosome mitotique. Cette structure correspond au niveau de compaction chromatinien le plus élevé.



Figure I.2 : Structure du nucléosome canonique. Le nucléosome est un octamère d'histones autour duquel la molécule d'ADN, 146 pb, est enroulée. L'octamère est composé de deux histones H2A, deux histones H2B, deux histones H3 et deux histones H4. La double hélice d'ADN est représentée en vert foncé et marron, les histones sont représentées en jaune pour H2A, en rouge pour H2B, en bleu pour H3, en vert clair pour H4. A gauche est représentée une vue de l'axe formé par l'hélice d'ADN, celle de droite est une vue perpendiculaire à cet axe. (D'après Luger et al., 1997)

Le plus bas niveau d'organisation de la chromatine est le nucléosome, au sein duquel l'ADN est super-enroulé deux fois (correspondant à 146 pb) autour d'un

octamère d'histones (voir Figure I.2) (Luger et al., 1997). Les nucléosomes sont reliés les uns aux autres par un court segment d'ADN. Le collier de perle ou nucléofilament, formé par les nucléosomes, va être replié sous forme de fibre de 30 nm de diamètre. L'histone H1 lie la molécule d'ADN au niveau de son entrée et de sa sortie du nucléosome, permettant la stabilisation de la fibre de 30nm (Felsenfeld and Groudine, 2003). Cette fibre est alors surenroulée en fibres de niveaux de compaction supérieurs. Ces niveaux de compaction, supérieurs au nucléosome, ne sont toujours pas résolus (Swedlow and Hirano, 2003).

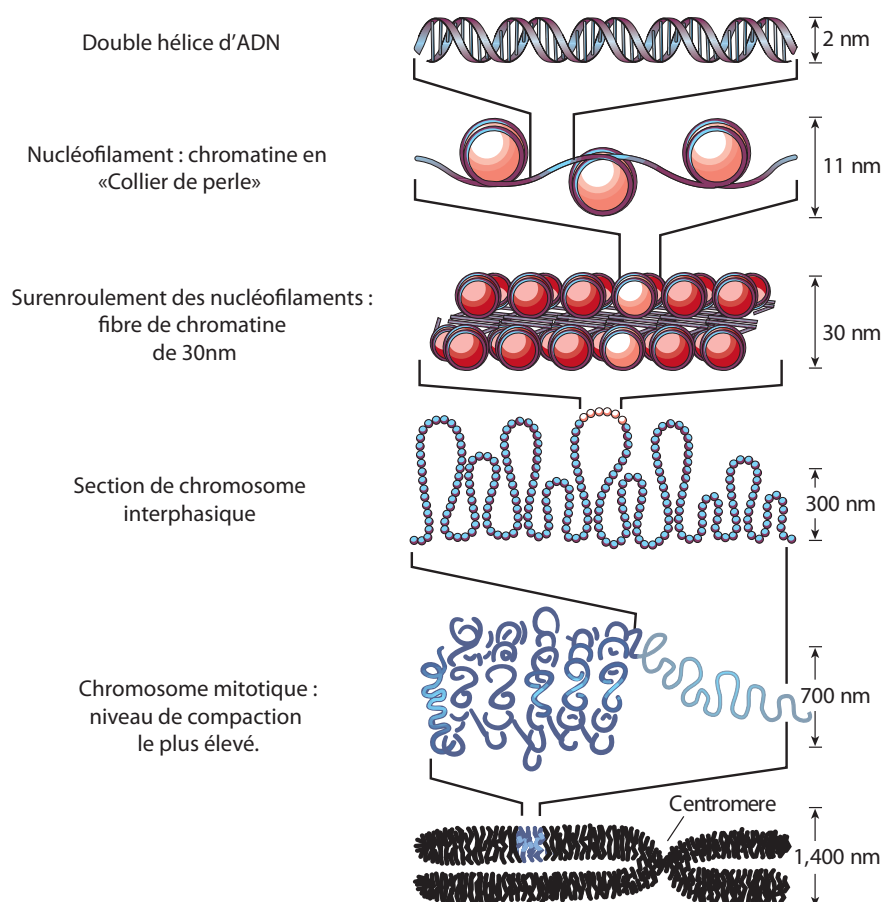


Figure I.3 : Niveaux de compaction de la molécule de l'ADN. La double hélice d'ADN surenroulée autour des nucléosomes va former le nucléofilament, ou collier de perles, de 11nm de diamètre. Le surenroulement de cette structure va former la fibre de 30 nm. Celle-ci est surenroulée durant l'interphase à différents niveaux, puis en chromosome mitotique : niveau de compaction le plus élevé. (D'après Felsenfeld and Groudine, 2003).

Un modèle, basé sur des mesures de l'élasticité du chromosome mitotique, a mis en évidence la présence de quelques axes rigides permettant à la partie souple de la chromatine de s'amarrer (Houchmandzadeh and Dimitrov, 1999).

La ségrégation des chromosomes est dirigée par les centromères, un locus chromatinien à partir duquel se forme une structure particulière : le kinétochore. Celui-ci permet de relier les chromosomes aux microtubules, acteurs dans leur ségrégation de part et d'autre des pôles cellulaires. Il y a un kinétochore par chromosome, ce qui permet d'éliminer les risques de cassures.

I.4 Les kinases mitotiques

Il existe quatre grandes familles de kinases régulatrices de la mitose : les Cyclin-Dependant Kinases (CDK), les Polo-Like Kinases (PLK), les NIMA-related kinases (NrK) et les kinases Auroras.

a) CDK kinases

Les kinases cycline-dépendantes (CDK pour Cyclin-Dependant Kinase) ont été découvertes chez la levure, au cours d'un criblage de gènes impliqués dans la régulation de la division cellulaire (Malumbres, 2011). Les CDK sont des Serine/Thréonine kinases, leur association avec les cyclines est essentielle à leur activation. Les cyclines sont synthétisées en réponse à des stimuli mitotiques. Le cycle cellulaire est principalement régulé par les complexes résultants de l'association entre cyclines et CDK. CDK1 est la CDK maitresse de la régulation du cycle. Elle est, en effet, responsable de nombreuses transitions au cours du cycle, dont l'entrée en mitose. Elle présente une localisation nucléaire en interphase. Le complexe CDK1-Cycline B est impliqué dans de nombreux processus mitotiques, en particulier en début de mitose (Salaun et al., 2008). Puis CDK1 est inactivée par dégradation de la Cycline B en début d'anaphase, déclenchant l'entrée en cytokinèse (Musacchio and Salmon, 2007).

b) PLK kinases

Les Polo-like-kinases (PLK) sont une famille de quatre protéines. Toutes partagent, au niveau de leur partie N-terminale, un domaine hautement conservé : le « polo-box domain » (PBD) (Salaun et al., 2008). Ce domaine est, entre autre, impliqué

dans leur localisation. Des mutants des PLK ont été identifiés, chez la *Drosophile*, comme provoquant des défauts au niveau des fuseaux mitotique et méiotique. PLK1 est la principale PLK mitotique. Elle est localisée dans le cytoplasme et au niveau des centrosomes en interphase, se concentre sur les kinetochores en prométaphase puis au niveau du corps résiduel en cytokinèse. PLK1 est essentielle à la division cellulaire. Elle est impliquée dans la maturation des centrosomes, l'entrée en mitose et la cytokinèse. (Salaun et al., 2008; Malumbres, 2011).

c) NIMA-related kinases

Les NIMA-related kinases, ou Nrk, sont une grande famille de kinases, toutes n'étant pas impliquées en mitose, qui partagent une séquence homologue à la kinase mitotique d'*Aspergillus nidulans*, NIMA (Never In Mitosis A). La kinase humaine Nek2 est la plus étudiée. Elle est impliquée dans le comportement des centrosomes et dans la cytokinèse. Sa surexpression, chez la *Drosophile*, provoque des défauts de cytokinèse. Nek2 est située sur les centrosomes et les kinétochores. (Salaun et al., 2008).

d) Aurora kinases

Les kinases Auroras sont des Sérine/Thréonine kinases impliquées dans la régulation de nombreux processus mitotiques et méiotiques. Une expression aberrante de ces kinases peut aboutir à la cancérisation des cellules. Elles ont été mises en évidence chez la *Drosophile*, qui possède deux kinases Auroras. *Saccharomyces Cerevisiae* n'en possède qu'une : Ipl1 « increase in ploidy 1 ». Les mammifères possèdent trois Aurora : A, B et C. Aurora A présente une localisation différente d'Aurora B et C tout au long de la division cellulaire (Fu et al., 2007).

Aurora A

De la fin de la phase S au début de la phase G1 suivante, Aurora A est localisée au niveau des centrosomes et du matériel pericentriolaire. Pendant la mitose, sa localisation s'étend sur l'extrémité proximale des microtubules du fuseau mitotique. Aurora A centrosomale s'échange rapidement avec Aurora A cytoplasmique. Aurora A lie la protéine TPX2, un partenaire nécessaire à son activation et à sa localisation (Fu et al., 2007; Giet et al., 2005).

Aurora A est impliquée dans la séparation des paires de centriole, dans l'assemblage du fuseau bipolaire et dans la cytokinèse. La kinase joue aussi un rôle dans la maturation des centrosomes dupliqués, et dans la promotion de la destruction de l'enveloppe nucléaire en début de mitose (Fu et al., 2007; Giet et al., 2005; Salaun et al., 2008).

Aurora B

Aurora B a un profil de localisation caractéristique des protéines passagères. Elle est tout d'abord localisée au niveau des bras chromosomiques, puis se concentre au niveau des centromères, entre la prophase et la prométaphase. Elle est retrouvée au niveau du sillon de division en anaphase et du corps résiduel en télophase (Giet et al., 2005; Ruchaud et al., 2007; Salaun et al., 2008).

Elle est impliquée dans la condensation et congression des chromosomes mitotiques, puis dans la formation et constriction du sillon de division. Elle serait également impliquée dans l'étape d'abscission (Giet et al., 2005; Ruchaud et al., 2007).

Aurora C

Aurora C, contrairement à Aurora A et B qui ont un ancêtre commun, a évolué à partir d'Aurora B (Salaun et al., 2008). Son profil de localisation est similaire à celui d'Aurora B. Aurora C est non-ubiquitaire. Elle est exprimée principalement dans les tissus testiculaires et les gamètes subissant la méiose. En absence d'Aurora B, Aurora C interagit avec ses partenaires (Incenp, Survivine, Boréoline), complémente les fonctions d'Aurora B et rétablit un phénotype correct, sans polyploidie. Dans les gamètes, Aurora C s'associe avec INCENP. Lorsque la kinase est surexprimée, elle adopte le comportement d'Aurora A en interphase et d'Aurora B en mitose (Giet et al., 2005; Salaun et al., 2008).

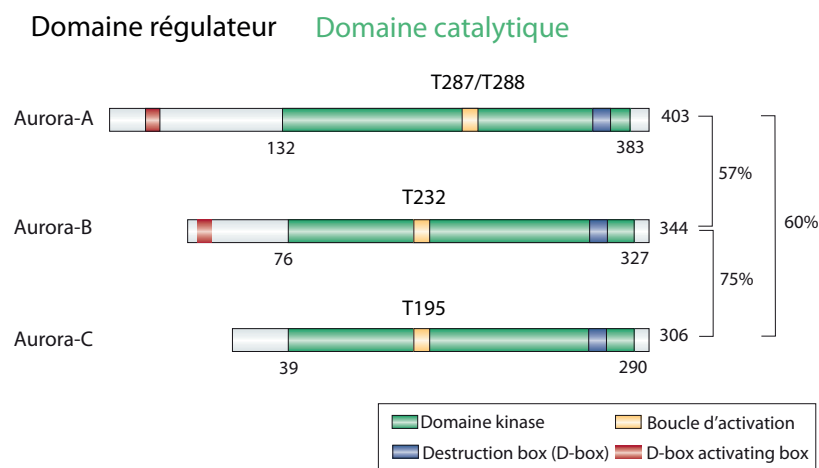


Figure I.4 : Structures des kinases Aurora humaines. Les kinases Aurora possèdent principalement deux domaines, un régulateur et un catalytique. Elles possèdent des domaines impliqués dans la régulation de leur dégradation : les domaines D-box (Destruction-box) et D-box activating box (ou A-box). Les Aurora présentent une forte homologie au niveau C-terminal et un domaine N-terminal variable. (D'après Fu et al., 2007 et Keen and Taylor, 2004).

La longueur des Auroras varie de 309 à 403 acides aminés. Elles possèdent un domaine N-terminal régulateur, et un domaine kinase C-terminal (voir Figure I.4). Aurora A et Aurora B partagent 70% d'homologie au niveau de leur domaine kinase. Cette homologie a des implications au niveau des substrats communs et de l'utilisation d'inhibiteurs. Les gènes correspondants se situent au niveau des locus 20q13.2 pour Aurora A, 17p13.1 pour Aurora B et 10q13 pour Aurora C (Giet et al., 2005).

Les Aurora sont à peine détectées après la sortie de mitose et l'entrée en G1. L'ubiquitine ligase APC/Cyclosome, complexé au modulateur Cdh1, va adresser les Aurora au protéasome 26S, entraînant leur destruction. Le système de dégradation des Aurora est basé sur la présence d'une D-box (Destruction Box) au niveau C-terminal, d'une A-box (ou D-Box Activating Domain) au niveau N-terminal, et d'une KEN-box. La dégradation d'Aurora A requiert la présence des domaines D-box et A-box, à la différence d'Aurora B dont la dégradation est médiée par les domaines KEN-box et A-box. Cette distinction peut expliquer en partie la différence de chronologie dans l'activité des deux kinases. (Fu et al., 2007; Kollareddy et al., 2008).

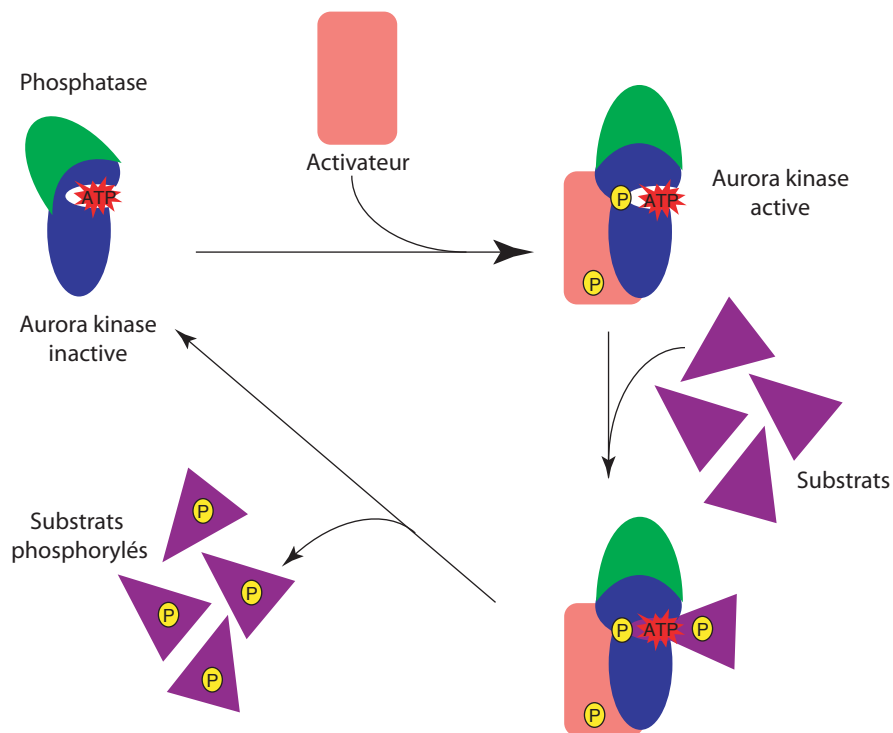


Figure I.5 : Modèle d'activation des kinases Auroras. La liaison de la kinase avec un activateur va provoquer l'autophosphorylation de celle-ci ainsi que la phosphorylation de l'activateur. La kinase aura alors sa forme complètement active. La déphosphorylation de la kinase par une phosphatase aboutie à la désactivation de la kinase. (D'après Giet et al., 2005).

Au niveau structural, les Auroras possèdent une charnière qui joint les deux lobes de leur domaine catalytique. Le lobe N est responsable du positionnement de l'ATP par une hélice alpha, alors que la boucle d'activation, au niveau du lobe C, contient les substrats. Il est nécessaire que les deux lobes atteignent une certaine conformation pour que la kinase soit totalement active. La liaison avec leurs partenaires, TPX2 et Incenp pour Aurora A et Aurora B respectivement, est primordiale pour leur localisation et activation (voir Figure I.5) (Giet et al., 2005 ; Fu et al., 2007). Un mutant Aurora A G198A se lie à Incenp et remplit les fonctions mitotiques d'Aurora B. L'inverse, Aurora B mutée liée à TPX2, ne se vérifie pour autant pas (Hans et al., 2009). La liaison avec Incenp active Aurora C *in vitro* (Giet et al., 2005).

I.5 Les kinases Aurora, oncogéniques ?

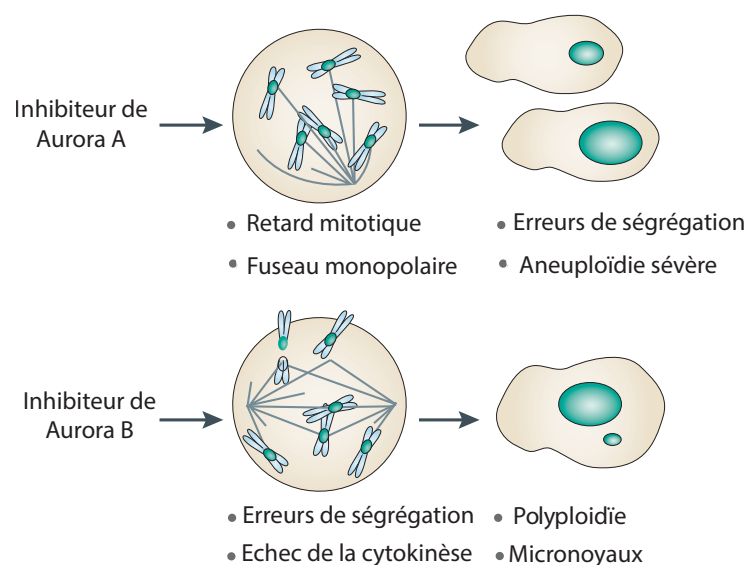


Figure I.6 : Phénotypes cellulaires obtenus après suppression de l'activité de Aurora A et B.

En cas d'inhibition d'Aurora A, un défaut de formation du fuseau mitotique est observé. Celui-ci, monopolaire, provoque un retard mitotique, et de gros défauts de ségrégation du matériel génétique, aboutissant à une aneuploïdie sévère. En cas d'inhibition d'Aurora B, des défauts mitotiques, combinés à un échec de la cytokinèse, aboutissent à la formation, soit de cellules tétraploïdes, soit de cellules contenant des micronoyaux. (D'après Lens et al., 2010).

Les kinases Auroras ont un rôle prépondérant dans la régulation de la mitose. L'interférence ARN sur Aurora A et B entraîne la formation anormale du fuseau mitotique dans le cas de cellules déplétées en Aurora A, des erreurs dans l'alignement des chromosomes en métaphase et un échec de la cytokinèse pour Aurora B. La suppression d'Aurora A semble être plus délétère pour la survie de la cellule que celle d'Aurora B (Lens et al., 2010) (voir Figure I.6). Une anomalie dans le niveau d'expression des kinases aboutit à des erreurs de répartition du matériel génétique, menant à l'aneuploïdie (Lens et al., 2010) (voir Figure I.7). Un défaut dans les Auroras entraîne alors la cancérisation des cellules en augmentant l'instabilité chromosomique (Torres et al., 2008; Lens et al., 2010). En effet, les kinases Aurora sont surexprimées dans de nombreuses lignées cancéreuses.

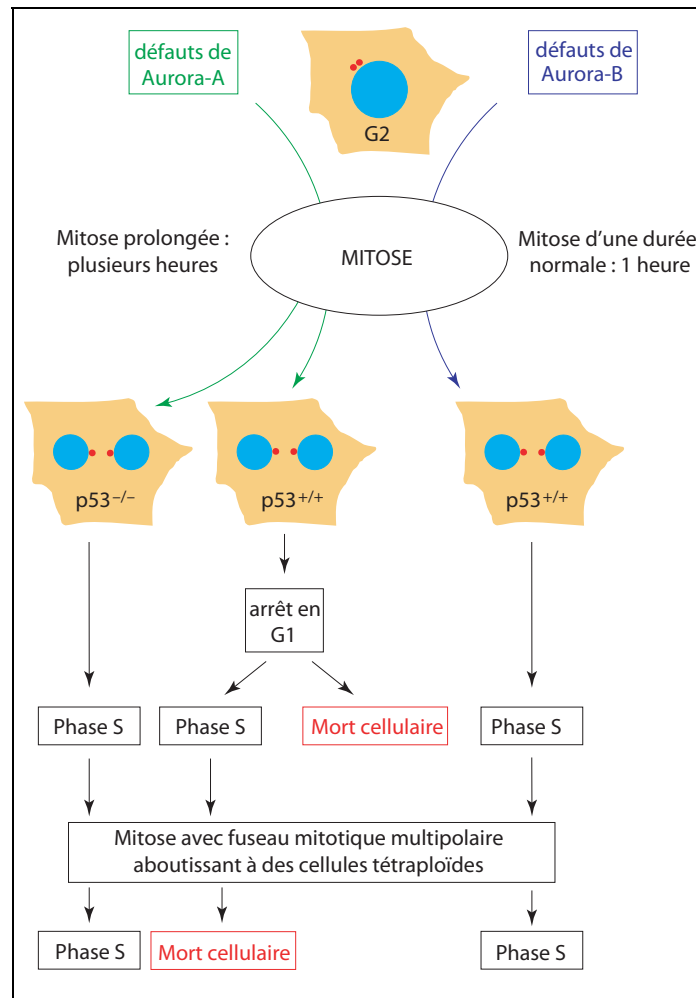


Figure I.7 : Destinée des cellules comportant un défaut au niveau des Aurora. Une erreur au niveau d'Aurora A entraîne la formation d'un fuseau mitotique défectueux, inhibant l'entrée en anaphase. La mitose est prolongée pendant plusieurs heures, jusqu'à ce que les cellules en sortent pour devenir tétraploïdes. Si de telles cellules comportent un p53 inactif, elles rentreront dans une nouvelle phase S, subissant une nouvelle mitose défectueuse. Si leur p53 est actif, les cellules s'arrêteront en G1. Suivant la sévérité des défauts détectés par le point de contrôle post-mitotique, les cellules rentrent en apoptose ou poursuivent un nouveau cycle cellulaire. En présence d'une Aurora B défectueuse, la cellule subit un échec de la cytokinèse, aboutissant à une cellule tétraploïde. Cette cellule subira un nouveau cycle cellulaire puis continuera à se diviser. (D'après Giet et al., 2005).

Aurora A humaine a tout d'abord été isolée en tant que produit du gène *BTAK* (*Breast tumor amplified kinase*), son ARN messager étant surexprimé dans les cancers du sein et participant à la transformation des cellules. En outre, Aurora A est localisée sur le locus 20q13, une région souvent amplifiée dans les leucémies, les neuroblastomes, les cancers du sein, colorectaux, ovariens, du colon, de la prostate, et autres cancers cervicaux ; dans lesquels Aurora A est, en effet, retrouvée surexprimée. Cette

surexpression de la kinase a été associée à la transformation maligne d'un certain nombre de lignées cellulaires. Elle aboutit notamment *in vitro* à l'immortalisation des cellules NIH3T3 et des fibroblastes Rat1 de rongeurs, provoquant la formation de tumeurs une fois injectée dans des souris « nude ». Un traitement interférence ARN dirigé contre Aurora A supprime la croissance de la tumeur et augmente la sensibilité de celle-ci aux chimiothérapies et irradiations UV dans les cellules humaines. Sa surexpression dans les cancers est associée à un mauvais pronostic. De plus l'oncogénicité d'Aurora A est renforcée par l'ajout d'autres éléments oncogéniques. (Fu et al., 2007; Giet et al., 2005; Kollareddy et al., 2008)

Les propriétés oncogéniques d'Aurora B ne font pas l'objet d'un consensus. La surexpression d'Aurora B seule n'est pas suffisante pour provoquer la transformation des cellules, mais augmente la transformation provoquée par l'oncogène Ras mutée (Kanda et al., 2005). Aurora B surexprimée serait impliquée dans la transition métastatique (Giet et al., 2005). En effet, la progression maligne des carcinomes thyroïdiens anaplasiques corrèle avec la surexpression d'Aurora B (Sorrentino et al., 2004). Cette surexpression a aussi été rapportée dans les cancers oraux (Qi et al., 2007) et carcinomes primaires pulmonaires à non-petites cellules (Smith et al., 2007). Cependant, les souris déficientes en p-53, qui surexpriment Aurora B dans les glandes mammaires, ne développent pas de cancer. De même, à l'inverse d'Aurora A, la surexpression d'Aurora B ne permet pas la transformation des fibroblastes de rongeurs immortalisés (Kanda et al., 2005). Néanmoins, à l'instar d'Aurora A, Aurora B induit la tétraploïdisation ce qui augmente l'instabilité chromosomique et l'invasivité de ces cellules (Ota et al., 2002). Cela illustre un effet promoteur de tumeur d'Aurora B par génération de cellules tétraploïdes. Dans les glioblastomes, carcinomes ovariens et carcinomes hépatocellulaires, de hauts niveaux d'expression d'Aurora B sont associés à un mauvais pronostic. Toutefois, l'altération génétique du locus, portant un allèle codant pour Aurora B, a des conséquences minimales (Tchatchou et al., 2007), ce qui montre, une fois encore, le potentiel oncogénique limité d'Aurora B. (Fu et al., 2007; Giet et al., 2005; Kollareddy et al., 2008).

La caractéristique proto-oncogénique d'Aurora C a récemment été mise en évidence (Khan et al., 2011). La surexpression de la kinase aboutit à l'amplification des centrosomes et à la multinucléation. Dans des cellules NIH3T3 de souris, non seulement

les cellules sont transformées en cultures cellulaires, mais elle provoquent la formation de tumeurs une fois injectées dans des souris « nude » (Khan et al., 2011). De plus, Aurora C est surexprimée dans des lignées cellulaires cancéreuses telles que HepG2 et HUH7 (issus de carcinomes hépatocellulaires humains), MDA-MB-453 (issus de cancer du sein) et dans les cellules HeLa (Giet et al., 2005).

Pourquoi Aurora B et C se comportent-elles différemment ? La différence de localisation entre les deux protéines en G2 peut être un début d'explication. Aurora B est strictement nucléaire, alors qu'en interphase, Aurora C est retrouvée dans le cytoplasme et au niveau des centrosomes, tout comme Aurora A. Or l'amplification des centrosomes est une caractéristique commune dans la surexpression d'Aurora A et C, et un événement fréquent dans presque tous les types de cancers (Khan et al., 2011).

Rôle suppresseur de tumeur pour les Auroras ?

La formation de tumeurs est augmentée dans les souris KO d'un allèle Aurora A. Cela suggère que la kinase fonctionne comme suppresseur de tumeur haplo-insuffisant. En effet, dans les cas de polymorphismes F31I et V57I, la diminution de 15% de son activité est corrélée avec une augmentation des risques de développer un cancer de l'œsophage. Qu'en est-il pour Aurora B et Aurora C ? Les souris KO d'un allèle Aurora C ne présentent pas de phénotype particulier, mais le KO d'un allèle Aurora B favoriserait l'apparition de cancer, d'où un rôle suppresseur de tumeur pour Aurora B (Lens et al., 2010).

I.6 Inhibiteurs des Auroras.

Il existe plusieurs inhibiteurs des kinases Auroras, plus ou moins spécifiques. La sélectivité des inhibiteurs réside, en majeure partie, dans la différence entre résidus présents au sein des sites de liaison de l'ATP des différentes kinases. En effet la plupart des inhibiteurs agissent comme compétiteur de l'ATP. VX-680 et PHA-680632 sont des inhibiteurs des Auroras, Hesperadine, ZM447439, Reversine et AZD1152 sont plus spécifiques d'Aurora B, et MLN8054 d'Aurora A (Katayama and Sen, 2010).

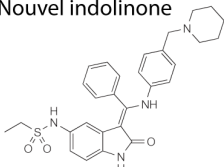
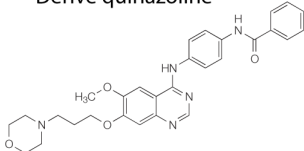
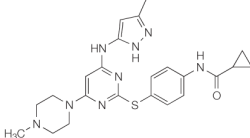
Composé	Classe chimique	Activité	Sélectivité
Hesperadine	Nouvel indolinone 	Inhibe Aurora B immunoprécipitée avec une valeur IC ₅₀ de 250 nM ; dans les cellules 20-100 nM sont suffisants pour réduire la phosphorylation de H3	Inhibe plusieurs autres kinases <i>in vitro</i>
ZM447439	Dérivé quinazoline 	<i>In vitro</i> inhibe Aurora A, Aurora B et Aurora C avec des valeurs IC ₅₀ proximatives de 100nM.	N'inhibe pas la plupart des autres kinases (IC ₅₀ >10μM).
VX-680	4,6 di-amino-pyrimidine 	<i>In vitro</i> inhibe Aurora A, Aurora B et Aurora C avec des constantes d'inhibition (K _i) de 0,6, 18 et 4,6 nM respectivement	Inhibe la kinase FLT3 avec un K _i de 30nM

Tableau I.1 : Présentation des principaux inhibiteurs des kinases Aurora. (D'après Keen and Taylor, 2004; Katayama and Sen, 2010).

Propriétés anti-oncogéniques des inhibiteurs

Dans les modèles de xénogreffes de leucémies, cancer du colon et du pancréas, le traitement avec VX-680 inhibe la croissance tumorale. ZM447439, dans les expériences de formation de colonies, est plus toxique dans des cellules proliférantes que non-proliférantes (Fu et al., 2007). VX-680, PHA-680632, AZD1152 et MLN8054 ont une activité anti-tumorale dans des modèles de Xénogreffes chez les rongeurs. Les tests cliniques en phase I et II sont en cours (Girdler et al., 2008; Katayama and Sen, 2010).

VX-680 est entré dans des essais cliniques de phase II (D'Alise et al., 2008; Katayama and Sen, 2010). Il bloque la prolifération cellulaire et induit l'apoptose de différents types de tumeurs humaines. Il inhibe également la prolifération tumorale de leucémies, tumeurs du colon, tumeurs pancréatiques, dans des modèles de xénogreffes (Harrington et al., 2004). Reversine inhibe la prolifération et induit la mort d'une large variété de lignées tumorales. Il se révèle moins toxique que VX-680 sur des cellules saines (D'Alise et al., 2008).

Résistance aux inhibiteurs ?

La poche de liaison à l'ATP d'Aurora B est relativement plastique ce qui explique la résistance de la kinase à un certain nombre d'inhibiteurs. Cela présage de l'apparition de mutants d'Aurora B au cours des tests cliniques. Ainsi plusieurs ont déjà été identifiés *in vitro*. En effet, les mutations Y156H, G160E et G160V, au niveau du site catalytique, ont été caractérisées comme abolissant l'effet inhibiteur de ZM447429, VX-680, MLN8054 et de l'Hesperadine. La mutation H250Y située au niveau de la boucle d'activation provoque aussi la résistance d'Aurora B à ZM447429 (Girdler et al., 2008).

II. Complexe des protéines passagères

Les protéines passagères permettent la coordination entre la ségrégation des chromosomes mitotiques et la cytokinèse. Ces protéines possèdent une localisation particulière au cours de la mitose, d'où leur qualificatif de protéines passagères (Cooke et al., 1987). Elles forment un complexe, le CPC : Chromosomal Passenger Complex.

La Sérine/Thréonine kinase Aurora B représente la sous-unité catalytique du complexe. Les trois autres protéines présentes ont des rôles structuraux. Il s'agit des protéines Incenp, Survivine et Boréaline. L'absence de l'un des membres, par extinction interférence ARN, est suffisante pour abolir la localisation des autres (Honda et al., 2003; Carvalho et al., 2003). En absence du complexe, on observe des défauts d'alignement des chromosomes en métaphase, de ségrégation des chromosomes et des échecs de la cytokinèse. Chacun des membres est phosphorylé par Aurora B, y compris la kinase elle-même (Ruchaud et al., 2007).

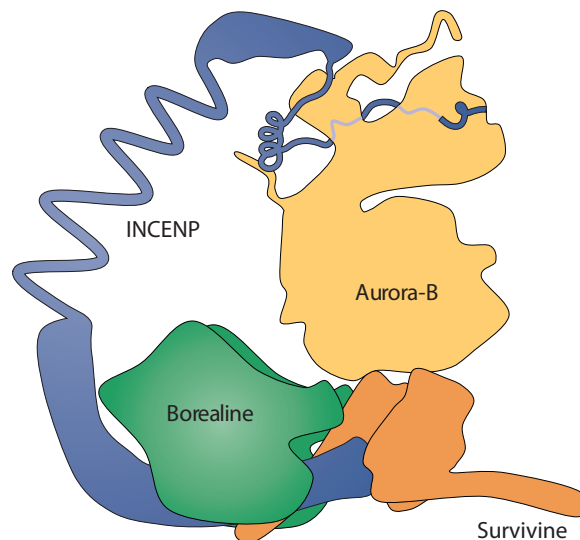


Figure II.1: Représentation graphique du complexe des protéines passagères. Le complexe est composé d'Incenp, Survivine, Boréaline, et de la sous-unité catalytique Aurora B. Incenp interagit avec chacun des membres du complexe (D'après Ruchaud et al., 2007).

II.1 Localisation particulière en mitose

Le qualificatif de protéines passagères a été employé pour la première fois pour la protéine Incenp (Cooke et al., 1987). En effet, ces protéines changent de localisation au cours de la mitose. On les retrouve au niveau des bras chromosomiques en G2/prophase. Elles se concentrent alors au niveau de la partie interne des centromères où elles sont localisées en début de prométaphase. Au cours de la transition métaphase/anaphase, les protéines passagères sont délocalisées au niveau du fuseau central de microtubules, lieu du futur sillon de division. Elles vont rester sur le fuseau tout au long de l'anaphase pour se retrouver, en cytokinèse, au niveau du corps résiduel : pont cytoplasmique entre les deux cellules filles. Celui-ci va être résolu par l'abscission, étape finale de la mitose (Ruchaud et al., 2007).

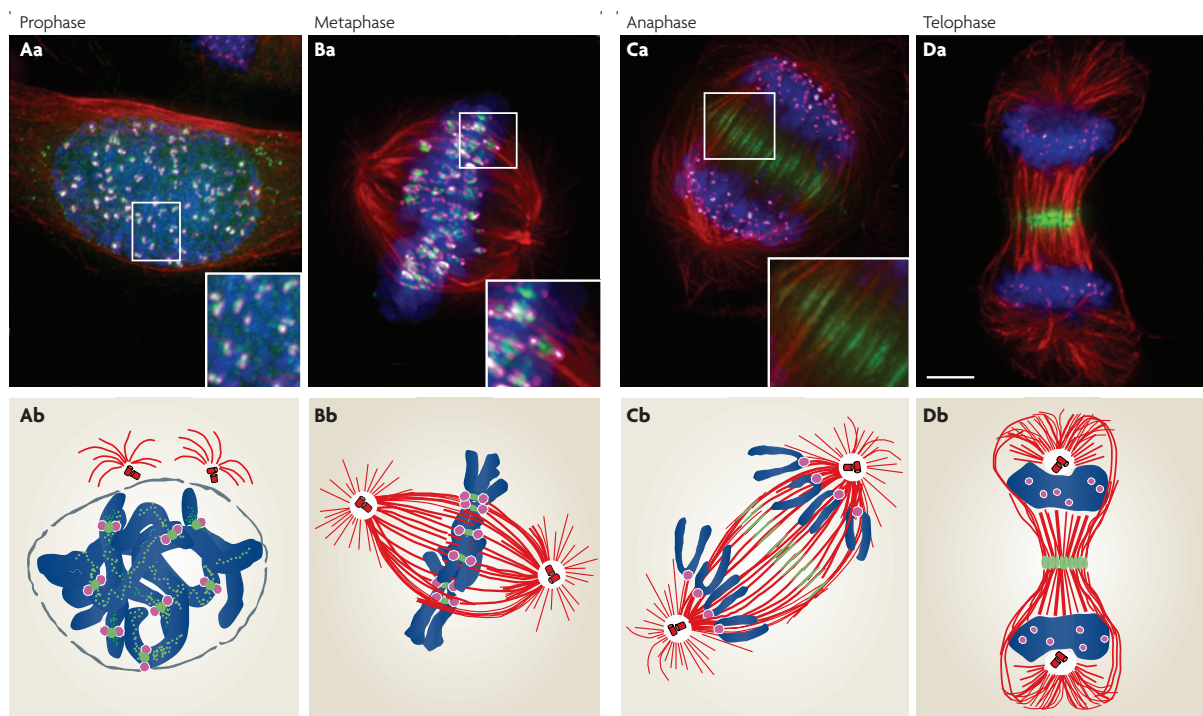


Figure II.2 : Localisation du CPC au cours des différentes phases de la mitose. En bleu sont représentés les chromosomes ; en rouge les microtubules et en vert le complexe des protéines passagères. En début de mitose le CPC, situé sur les bras chromosomiques, se concentre au niveau de la partie interne des centromères. En début d'anaphase le complexe est relocalisé au niveau du fuseau central de microtubules, situé sur le sillon de division (D'après Ruchaud et al., 2007).

Cette localisation spécifique est liée aux différents rôles du complexe tout au long de la mitose. Tout d'abord, sa localisation au niveau des bras chromosomiques en début de mitose serait liée à l'implication du complexe dans la condensation des chromosomes en prophase. Au niveau des centromères, la présence du CPC est associée à sa fonction dans la congression des chromosomes sur la plaque équatoriale (Ruchaud et al., 2007). Au niveau du fuseau central, le complexe est impliqué dans la formation et constriction du sillon de division (Glotzer, 2009). Le complexe est présent dans le corps résiduel où il est suspecté d'être impliqué dans le contrôle de l'abscission (Steigemann et al., 2009).

D'autres protéines présentent une localisation similaire, telles que Orc 6 ou CENP-E, mais ne sont pas pour autant qualifiées de protéines passagères. Cela semble dû au fait que ces protéines n'appartiennent pas au complexe CPC. En cas d'interférence ARN dirigée contre ces protéines la localisation du CPC n'est pas perturbée. En revanche la protéine TD60 n'appartient pas au complexe, cependant sa localisation, de type protéine passagère, est abolie en cas d'interférence ARN sur l'une des protéines du complexe et vis versa (Ruchaud et al., 2007).

II.2 Présentation des différents membres du CPC

Aurora B :

Aurora B est une enzyme de 39 kDa. Elle présente un repliement bipolaire caractéristique des kinases. Son lobe N-terminal (les acides aminés 86 à 174), riche en feuillets β , interagit avec des régulateurs de la kinase. Son lobe C-terminal (les acides aminés 175 à 347), en majorité composé d'hélices α , sert de site d'amarrage pour les substrats. Le site de liaison à l'ATP se situe entre les deux lobes (Sessa et al., 2005). Les acides aminés 344 à 333 de l'extrémité C-terminale sont impliqués dans la localisation de la kinase en mitose (Scrittore et al., 2005). La partie INBOX d'Incenp forme une couronne moléculaire, qui entoure aux trois quart le lobe N-terminal et la seconde moitié de l'extension C-terminale d'Aurora B (les acides aminés 348 à 361) (Sessa et al., 2005).

Incenp :

Incenp ou **I**nn**e**r **C**entromere **p**rotein a été mise en évidence dans un criblage visant à déterminer quelles étaient les protéines associées avec le chromosome mitotique de poulet (Cooke et al., 1987). Elle est exprimée tout au long du cycle, mais subit de nombreuses phosphorylations au cours de la mitose (Xu et al., 2010)).

Incenp est une grosse protéine de 120 kDa. Elle interagit avec tous les membres du CPC et sert d'échafaud au complexe. Elle est composée par trois domaines majeurs. Le domaine INBOX, situé dans la partie C-terminale, permet l'interaction avec Aurora B (Ruchaud et al., 2007). Un domaine coil-coiled, formé d'hélices alpha superenroulées, permettrait l'association d'Incenp avec les microtubules (Mackay et al., 1998). Et enfin le domaine CEN, siège de l'interaction avec Survivine et Boréaline (Ruchaud et al., 2007) (voir Figure II.3).

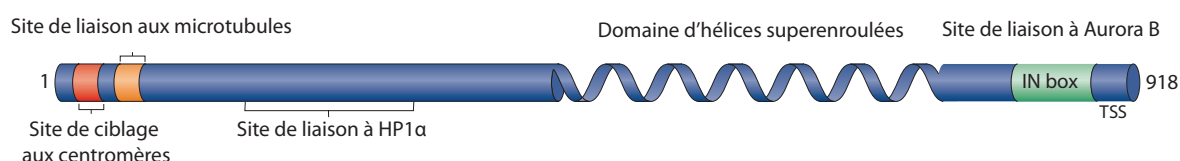


Figure II.3 : Représentation schématique d'Incenp et ses domaines. Le Domaine INBOX permet la liaison avec la partie N-terminale d'Aurora B. La liaison avec Survivine et Boréaline se fait au niveau N-terminal de la protéine. (D'après Ruchaud et al., 2007)

Incenp est phosphorylée par Aurora B au niveau de trois résidus TSS dans sa partie INBOX. Cette phosphorylation est la première étape dans l'activation du complexe et persiste tout au long de la mitose (Sessa et al., 2005). CDK1 phosphoryle deux thréonines dans la partie CEN, notamment T59. Cette modification post-traductionnelle est impliquée dans la relocalisation du complexe en anaphase (Vazquez-Novelle and Petronczki, 2010).

Incenp est impliquée dans la dynamique du complexe tout au long de la mitose. Elle interagit avec la chromatine centromérique et les microtubules du fuseau mitotique.

Survivine :

Survivine est une petite protéine de 17 kDa. Elle appartient à la famille des inhibiteurs d'apoptose IAP, dont un des traits communs est la présence d'un domaine à doigt de zinc de type BIR (Baculoviral inhibitory repeat) (Bourhis et al., 2007). Une caractéristique de Survivine est une longue hélice C-terminal, avec un segment court, qui relie cette partie au domaine BIR. Elle interagit avec Boréaline, Incenp et Aurora B. Elle est ubiquitinylée. La protéine dimérise *in vitro* mais ça *in vivo* (Bourhis et al 2007). L'ubiquitination de Survivine semble indispensable à la relocalisation du CPC au niveau des centromères, ainsi qu'au renouvellement d'Aurora B et Survivine (Vong et al., 2005).

Boréaline :

Boréaline, ou Dasra B, est une petite protéine de 31kD (Gassmann et al., 2004). Son homologue chez *C. elegans*, CSC1 (chromosome segregation and cytokinesis defective 1), a été identifié lors d'un criblage de mutants affectant la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse (Romano et al., 2003). Boréaline lie Survivine et Incenp mais pas Aurora B (Jeyaprakash et al., 2007). Dans les cellules mammifères Boréaline permet la stabilisation de l'interaction entre Incenp et Survivine. En effet dans des cellules déplétées en Boréaline, le complexe peut se former en présence d'une protéine recombinante liant de façon covalente Incenp et Survivine (Vader et al., 2006). De même en présence d'un anticorps permettant l'agglomération d'Incenp et Aurora B, Boréaline n'est plus nécessaire pour l'interaction du complexe avec la chromatine (Kelly et al., 2007).

TD-60 :

TD-60 ou Telophase Disk 60 est un facteur d'échange des guanosines. Elle présente la localisation d'une protéine passagère au cours de la mitose (Andreassen et al., 1991). En absence de TD60, le CPC ne se localise que partiellement au niveau des centromères (Mollinari et al., 2003) et n'est pas entièrement activé (Gassmann et al., 2004).

Des homologues des différentes protéines du complexe sont retrouvés chez tous les Eucaryotes (voir Tableau II.1).

<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	<i>X. laevis</i>	<i>C. elegans</i>	<i>D.melanogaster</i>	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Aurora B	Aurora B	XAurora B	AIR-2	ial	Ark1	Ipl1
INCENP	INCENP	XINCENP	ICP-1	incenp	Pic1	Sli15
Boréaline	Boréaline	Dasra-A, Dasra-B	CSC-1	Boréaline	Nbl1	Nbl1
Survivine	Survivine	XSurvivine	BIR-1	Deterin	Bir1/Cut17	Bir1

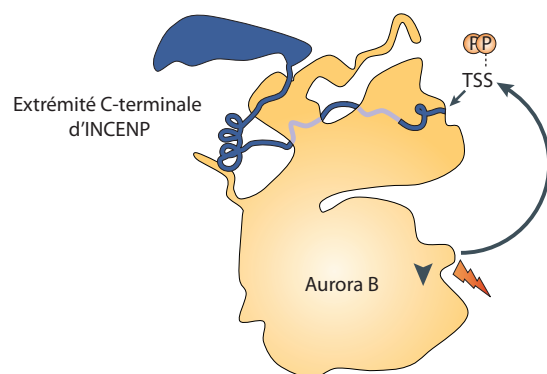
Tableau II. 1 : Homologues des membres du CPC en fonction des espèces (D'après Ruchaud et al., 2007; van der Waal et al., 2012).

II.3 Activation du complexe

L'activation du complexe est médiée par Incenp. Elle a lieu en deux étapes distinctes. Tout d'abord, la partie C-terminale d'Incenp forme une couronne autour du petit lobe d'Aurora B, ce qui provoque un changement allostérique au niveau de la boucle T de la kinase. Celle-ci adopte alors une conformation partiellement active. Cette forme provoque d'une part, la phosphorylation par Aurora B du motif TSS au niveau de la partie C-terminale d'Incenp (Honda et al., 2003), d'autre part, la libération de la queue C-terminale de la kinase. Cette dernière conformation correspond à la forme complètement active du complexe (Sessa et al., 2005) (voir Figure II.3). Le niveau de phosphorylation d'Incenp varie tout au long de la mitose, influant sur le niveau d'activité de la kinase. Cela semble suggérer un rôle de rhéostat de l'activité du CPC pour Incenp (Xu et al, 2010). L'activité d'Aurora B est au maximum au cours de la transition métaphase/anaphase (Khan et al 2011).

D'autres éléments semblent impliqués dans l'activation du complexe. Ainsi la phosphorylation préalable, par PLK1, de la Serine 20 de Survivine, serait indispensable à l'activation du complexe (Chu et al., 2011). De plus les ARN non-codants, résultants de la transcription des satellites mineurs, majoritaire en G2/M, favoriseraient l'activation d'Aurora B, mais aussi son interaction avec CENPA, histone variant et substrat mitotique d'Aurora B (Ferri et al., 2009). La phosphorylation de la Sérine 331 d'Aurora B, par la kinase Chk1, permettrait la phosphorylation optimale du site TSS d'Incenp, et donc, l'activation du complexe (Petsalaki et al., 2011).

1) Kinase partiellement active



2) Kinase complètement active

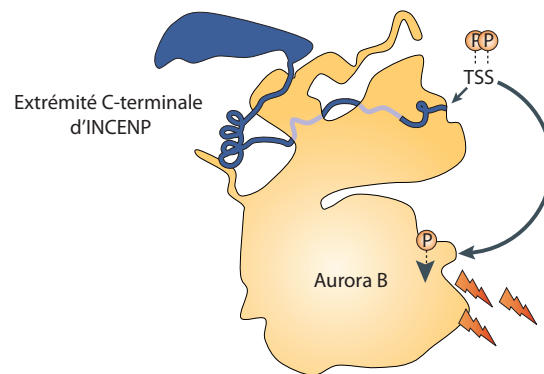


Figure II.3 : Activation du complexe des protéines passagères médiée par Incenp.

L'activation du complexe a lieu en deux étapes. 1) l'interaction avec Incenp active partiellement la kinase et provoque la phosphorylation du motif TSS, situé dans la partie INBOX d'Incenp. 2) La conformation d'Incenp phosphorylée au niveau du motif TSS active d'autant plus la kinase, qui se trouve alors sous sa forme complètement active (D'après Ruchaud et al., 2007).

Existence de sous-complexes ?

En cas de déplétion en Boréaline par interférence ARN, la phosphorylation de l'histone H3 par Aurora B, qui a lieu en début de prophase, est maintenue. Cela suggère l'existence d'un sous-complexe du CPC sans Boréaline (Gassmann et al., 2004). Une étude récente de FRAP a mis en évidence la mobilité, au niveau des centromères, du sous-complexe Aurora B/Incenp (Ahonen et al., 2009), différente de celle observée pour Survivine (Delacour-Larose et al., 2004). Cela suggère l'existence d'un sous complexe Aurora B/Incenp dépourvu de Survivine. Cependant, les sous-complexes Boréaline/Survivine et Incenp/Aurora B échouent seuls à se localiser correctement et n'assure pas les fonctions mitotique du CPC (Jeyaprakash et al., 2007). En présence d'un anti-corps dirigé contre Incenp cette dynamique disparaît, le complexe reste au niveau de la partie interne du centromère, des défauts mitotiques sont observés (Ahonen et al., 2009). On peut imaginer alors l'existence éphémère d'un sous-complexe Incenp-Aurora B au niveau des centromères. Cela pourrait permettre d'éteindre ou d'allumer successivement l'activité d'Aurora B au niveau de la partie interne du centromère, ou une signalisation rapide d'Aurora B dans le point de contrôle mitotique (Ahonen et al., 2009).

III. Implication du complexe des protéines passagères dans le déroulement de la mitose

III.1 Rôle du CPC en début de mitose

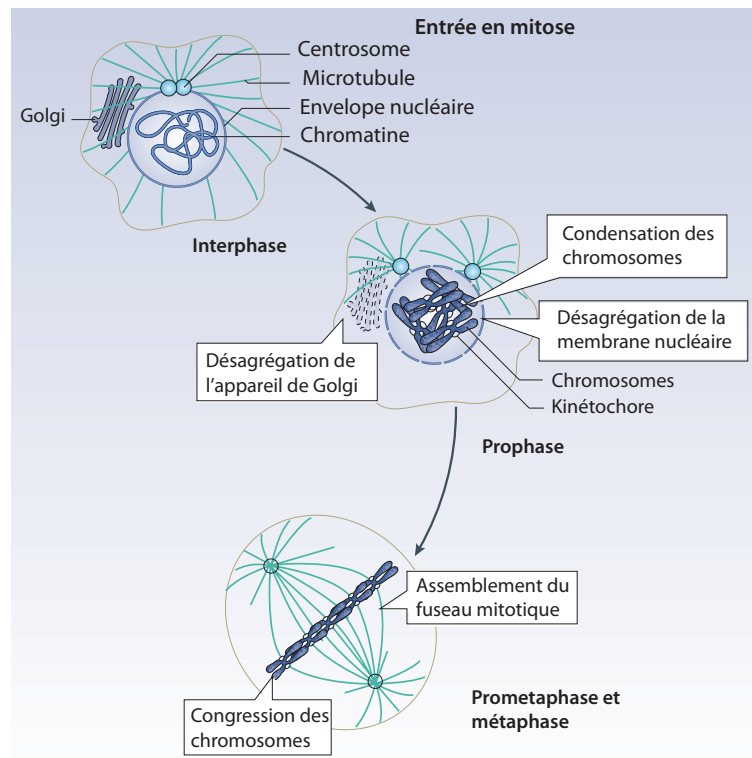


Figure III.1.1 : Schéma représentant les grandes étapes du début de mitose. La rupture de la membrane nucléaire marque l'entrée en prophase. Le Golgi et la membrane nucléaire se désagrègent en prophase et les chromosomes se condensent. En prometaphase, le fuseau mitotique nouvellement formé permet alors la congression des chromosomes. Lorsque ceux-ci sont correctement alignés sur la plaque équatoriale l'entrée en anaphase est permise. (D'après Wurzenberger and Gerlich, 2011).

a) Centromère et kinétochore

Le centromère est formé par la chromatine centromérique. Celle-ci est constituée en partie par des nucléosomes contenant l'histone variant CENPA, qui remplace l'histone canonique H3. En effet, les nucléosomes contenant CENPA recouvrent la partie externe du centromère ; cela s'explique par l'alternance entre les nucléosomes contenant uniquement H3 et ceux contenant CENPA. Les nucléosomes contenant CENPA arborent des propriétés physiques différentes (Tachiwana et al., 2011), ce qui peut être lié à leur interaction directe avec les éléments du kinétochore.

Par ailleurs, l'ADN de la chromatine centromérique présente la particularité d'avoir un pas à droite et un super-enroulement positif. Ceci semble avoir des conséquences lorsque l'on applique une tension sur la chromatine, comme c'est le cas en métaphase. Un modèle propose que la tension appliquée par les microtubules kinétochoriens provoque la scission des nucléosomes contenant CENPA en deux hémisomes ; l'un contenant deux histones CENPA et deux histones H4, et l'autre deux histones H2A et deux histones H2B. Ces nucléosomes peuvent être désassemblés plus facilement pour faciliter la clairance de CENPA (Conde e Silva et al., 2007). Les hémisomes composés de tétramères CENPA/H4 aurait une structure plus compacte (Westermann et al., 2007).

Le variant de l'histone canonique H2A, H2AZ, est présent au niveau de la chromatine péri-centromérique. Il fait office de frontière à ce territoire chromatinien, notamment en évitant la propagation de l'hétérochromatine. Des modifications post-traductionnelles des histones au niveau des centromères et péri-centromères ont de même été caractérisées. On retrouve ainsi, entre autres, des modifications des lysines 3 et 9 de l'histone H3 : H3 K4 di-méthylée et H3-K9 tri-méthylée (Greaves et al., 2007) (voir Figure III.2.2).

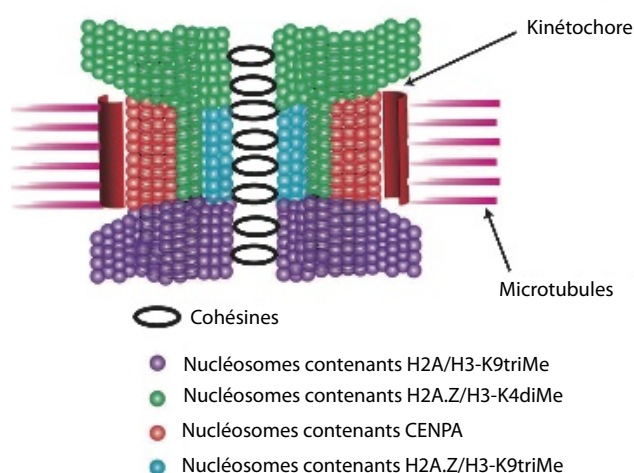


Figure III.2.2 : Spécificités épigénétiques de la chromatine centromérique et péri-centromérique. Ici sont représentées les régions centromériques et péri-centromériques du chromosome X inactif. La moitié externe de la chromatine centromérique est composée par des nucléosomes contenant CENPA et sa moitié interne par des nucléosomes contenant H3. Ici H2A.Z est présent au niveau de la partie interne des centromères ainsi que sur la chromatine péri-centromérique supérieure. Les modifications H3 K4 diMe et H3 K9 triMe délimitent des territoires chromatiniens différents (D'après Greaves et al., 2007).

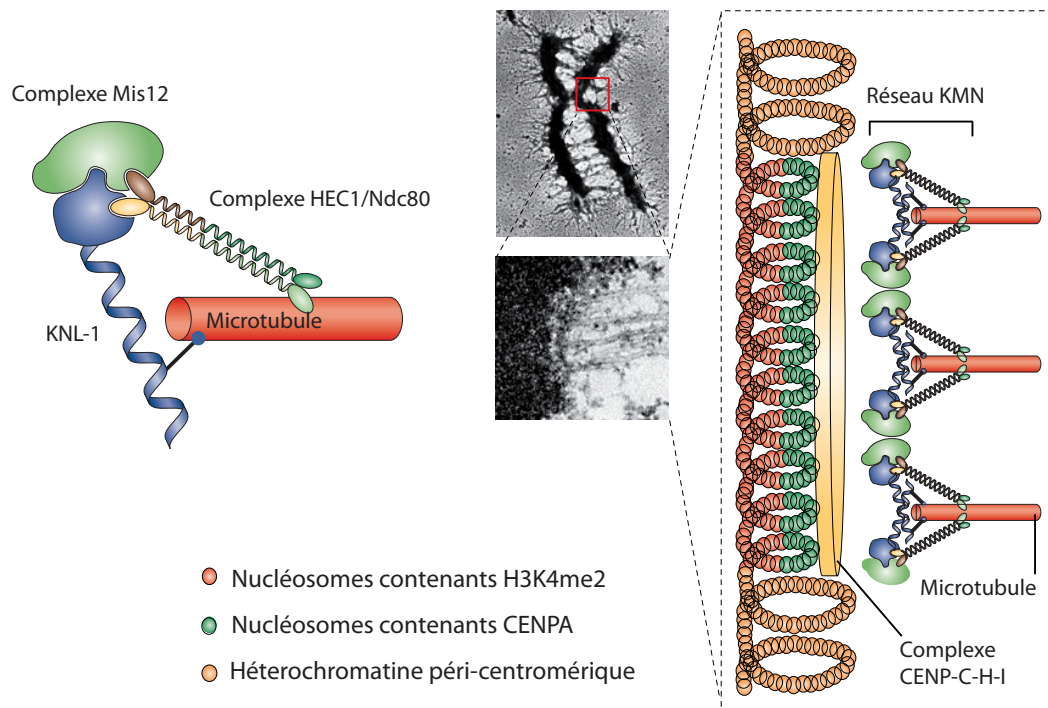


Figure III.2.3 : Le kinétochore. Le kinétochore est un échafaud protéique formé des complexes CENP-C-H-I et KMN. Le réseau KMN, formé par les complexes Mis12, KNL-1 et HEC1/Ndc80, permet l'interaction du kinétochore avec le microtubule. Le complexe CENP-C-H-I forme la partie du kinétochore interagissant avec les nucléosomes contenant CENPA de l'hétérochromatine centromérique. (D'après Ruchaud et al., 2007).

Le kinétochore est un échafaud de protéines formé par une « plaque » recouverte d'un « panier » dans lequel l'extrémité positive des microtubules va venir se loger. Il est constitué de trois principales structures (voir Figure III.2.3).

Les protéines CENPs (CENTromere Protein) forment la « plaque » du kinétochore. Elles-mêmes regroupées en différents complexes, elles constituent la partie interne du kinétochore. Elles permettent la liaison entre la chromatine centromérique et le « panier » du kinétochore. Parmi elles, la protéine CENPC joue un rôle très important, son absence empêche la formation des kinétochores. Elle interagit directement avec la chromatine en reliant les nucléosomes contenant CENPA à la plaque interne du kinétochore.

Le « panier » du kinétochore est formé par un ensemble de réseaux KMN, résultant de l'assemblage de trois complexes : le complexe KNL-1, le complexe Mis12 et le complexe Ndc80/HEC-1. Le complexe Ndc80/HEC-1 est la partie du kinétochore qui interagit avec les microtubules. Il est composé de 4 protéines, Ndc80/HEC1, Nuf 2,

Spc24 et Spc 25. HEC1 possède un domaine d'homologie avec la Calponine, siège de l'interaction avec les microtubules (Ciferri et al., 2008; Sundin and Deluca, 2010).

La partie interne du kinétochore (protéines CENPs) est associée à l'ADN centromérique tout au long du cycle cellulaire, alors que la partie externe du kinétochore (réseau KMN) est formée par des protéines dynamiques qui interagissent avec les microtubules en mitose (Yang et al., 2008).

b) Recrutement du CPC au niveau de la chromatine

La localisation correcte d'une kinase est intrinsèquement liée à son activité. Tous les membres du complexe des protéines passagères sont importants pour une localisation fidèle du complexe. En prophase, les bras chromosomiques vont se charger en CPC. Le complexe va ensuite se concentrer au niveau des centromères, où il est retrouvé lors de l'entrée en pro-métaphase.

i) Recrutement du CPC au niveau des bras chromosomiques

La localisation du CPC au niveau des bras chromosomiques semble faire intervenir Incenp et Boréaline. Incenp interagit avec la protéine HP1, constituant de l'hétérochromatine (Ainsztein et al., 1998). Boréaline est essentielle pour charger le CPC au niveau de la chromatine dans des extraits d'œufs de *Xenopus*. Elle pourrait permettre l'interaction du complexe avec l'ADN double brin qu'elle lie *in vitro* (Klein et al., 2006). De plus, la méthylation de l'ADN pourrait être importante pour charger le complexe au niveau de la chromatine.

ii) Recrutement du CPC au niveau des centromères

Au cours de la prophase, le CPC s'accumule au niveau des centromères. La partie N-terminale d'Incenp, où réside son domaine de liaison aux centromères (Ainsztein et al., 1998), Boréaline et Survivine sont suffisantes pour ce recrutement centromérique (Klein et al., 2006). Récemment, plusieurs équipes ont mis en évidence l'implication dans ce phénomène de deux modifications post-traductionnelles des histones H3 et H2A.

D'une part, la phosphorylation par la kinase Haspin de la Thréonine 3 de l'histone H3 permet la liaison de Survivine avec le nucléosome. En effet, Survivine possède un site

de liaison bipartite au niveau de son domaine BIR qui va reconnaître H3Thr3ph, ainsi qu'une alanine présente sur la queue N-terminale de H3 (Kelly et al., 2010). La kinase Haspin interagit avec les cohésines, uniquement présentes au niveau des centromères en fin de prophase, ce qui explique la localisation centromérique de la modification post-traductionnelle H3Thr3ph (Yamagishi et al., 2010). Aurora B phosphoryle Haspin, permettant la mise en place d'un rétrocontrôle positif sur sa propre localisation (Wang et al., 2011). Si l'expression de Haspin est éteinte par interférence ARN, le CPC reste localisé au niveau des bras chromosomiques (Wang et al., 2010). En présence d'un mutant de Survivine qui ne peut se lier au nucléosome, la localisation de MCAK, sous le contrôle de l'activité d'Aurora B, s'en trouve perturbée. Cependant l'étendue de la phosphorylation de CENPA, autre substrat d'Aurora B, ne varie pas lorsque Survivine n'adresse pas le complexe au niveau du nucléosome (Wang et al., 2010). Ces deux substrats ont une localisation différente. CENPA se trouve au niveau des centromères et MCAK au niveau de la partie interne du kinétochore. Une hypothèse serait la présence d'un pool diffusible d'Aurora B qui n'a pas besoin d'être localisé pour phosphoryler CENPA, ou alors l'existence d'un autre système d'adressage (Musacchio, 2010b).

En effet, une autre marque post-traductionnelle est importante dans la localisation centromérique du CPC. La phosphorylation de l'histone H2A par la kinase BUB1 au niveau de sa Thréonine 120 (Serine 121 chez *S.pombe*) semble permettre l'interaction de Shugoshin avec le nucléosome (Kawashima et al., 2010; Yamagishi et al., 2010). Or Shugoshin, et en particulier hSgo2 chez l'homme, est un adaptateur centromérique permettant le recrutement du CPC au niveau des centromères (Yamagishi et al., 2010). Survivine ou Boréaline, préalablement phosphorylées par la kinase CDK1, sont les éléments du CPC suspectés de directement interagir avec Shugoshin (Musacchio, 2010b). En effet, chez *S.pombe* la phosphorylation de Survivine par CDK1 permet l'interaction avec la Shugoshin. Dans les cellules humaines, cette phosphorylation au niveau de Boréaline remplirait ce rôle (Tsukahara et al., 2010).

La kinase BUB1 est localisée au niveau des kinétochores et la kinase Haspin est située au niveau des centromères, l'intersection entre ces deux kinases va délimiter la localisation du CPC et définir la partie interne du centromère (Yamagishi et al., 2010) (voir Figure III.2.4).

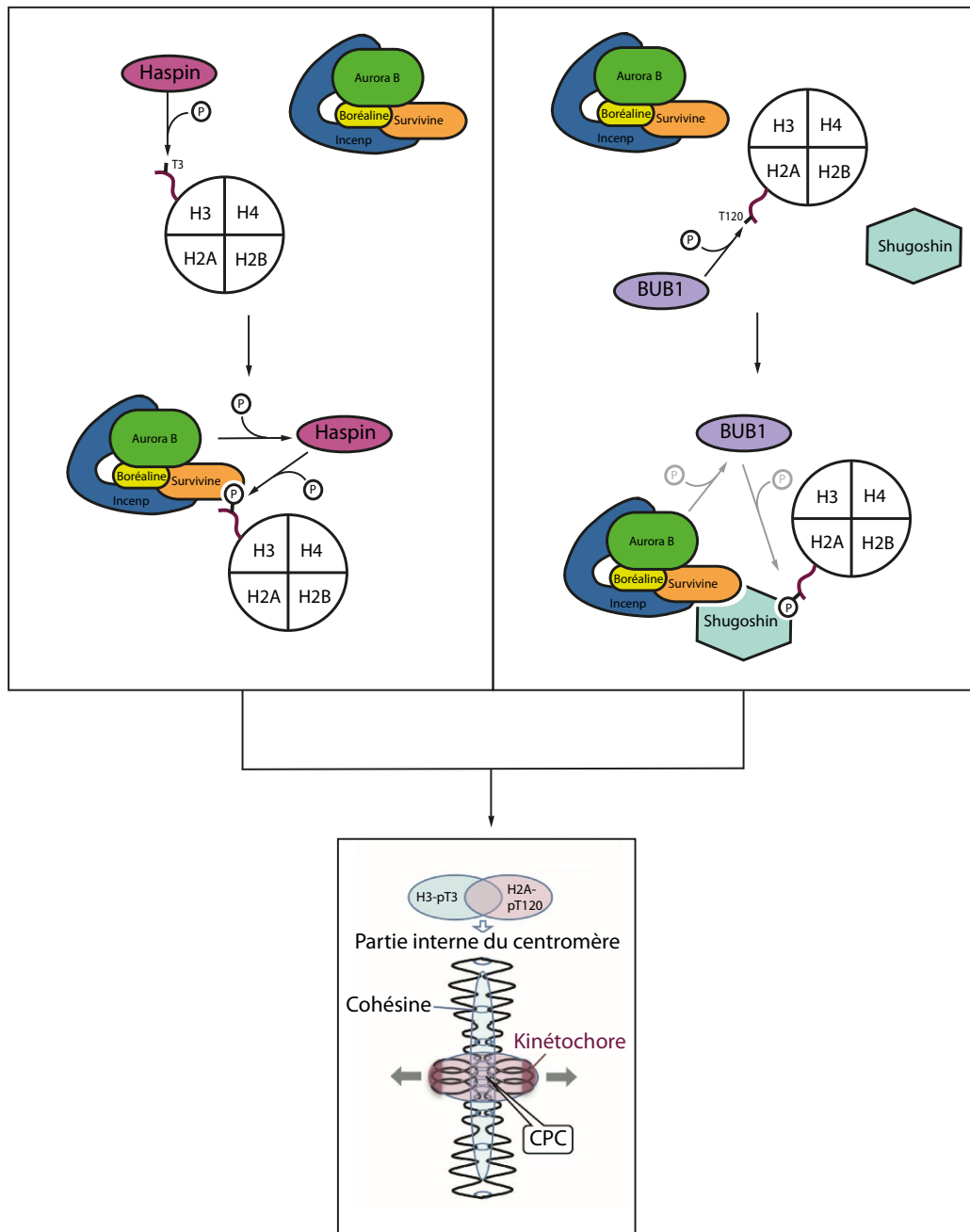


Figure III.2.4 : La combinaison de deux modifications post-traductionnelles est responsable du recrutement centromérique du CPC. A) La kinase Haspin phosphoryle la Thréonine 3 de H3, une telle phosphorylation est reconnue par le domaine BIR de Survivine ce qui va permettre au CPC de se localiser sur les nucléosomes H3 T3 phosphorylés. B) La kinase BUB1 phosphoryle la Thréonine 120, la Shugoshin va reconnaître cette marque, Survivine ou Boréaline va se lier à la Shugoshin présente au niveau du nucléosome et ainsi adresser le CPC à ce niveau. C) H3 T3 est uniquement présente au niveau de la partie interne des centromères en prométaphase car Haspin est recruté au niveau des chromosomes par les condensines, BUB1 a une localisation centromérique et péricentromérique, la combinaison de ces deux marques post-traductionnelles va délimiter la zone de recrutement du CPC, à savoir la partie interne des centromères (D'après Yamagishi et al., 2010).

D'autres éléments sont impliqués dans l'adressage optimal du CPC. Des ARN non-codants transcrits au niveau des satellites mineurs, répétitions de séquences centromériques caractéristiques du génome murin, participent à la formation de la chromatine centromérique. Ces ARN non-codants semblent rendre permissif l'environnement chromatinien pour l'interaction d'Aurora B et Survivine avec les nucléosomes contenant CENPA (Ferri et al., 2009). En prophase, Aurora A initie la phosphorylation de la Serine 7 de CENPA. Cette phosphorylation promouvoir le recrutement d'Aurora B qui, à son tour, phosphoryle CENPA. Un rétrocontrôle positif permettrait alors l'enrichissement d'Aurora B au niveau des centromères (Kunitoku et al., 2003).

c) Implication du CPC dans la structure du chromosome mitotique

Aurora B phosphoryle l'histone H3 tout au long des bras chromosomiques sur ses Serines 10 et 28, ainsi que la Serine 7 du variant d'histone CENPA. Ces phosphorylations débutent en G2 et continuent en prophase (Crosio et al., 2002; Zeitlin et al., 2001). L'absence de ces phosphorylations provoque des défauts mitotiques dans les cellules mammifères.

Chez certaines espèces, la phosphorylation de la Serine 10 de l'histone H3 semble être liée à la condensation de l'ADN sous forme de chromosomes mitotiques (Wei et al., 1999). C'est le cas chez *Tetrahymena*, par exemple (Hsu et al 2000). Chez la Drosophile, la Condensine semble recrutée avec la même chronologie que H3 est phosphorylée (Giet et Glover 2001). Cependant ce modèle ne présente pas de consensus. En effet, dans un certain nombre d'autres espèces, il semble y avoir une faible corrélation entre l'absence de phosphorylation de la Sérine 10 et la condensation des chromosomes (Adams et al. 2001, Lavoie et al 2002, MacCallum et al 2002, Hsu et al 2000).

Dans les cellules mammifères, Aurora B co-localise avec HP1 α en phase G2. HP1 organise la chromatine et induit en particulier la formation d'hétérochromatine. La phosphorylation de la serine 10 de H3 par Aurora B inhibe la liaison entre le chromodomaine de HP1 et la queue N-terminale d'H3 (Terada, 2006). HP1 va alors être dissociée de l'hétérochromatine en prophase. L'inhibition d'Aurora B inhibe le retrait d'HP1 de l'hétérochromatine (Terada, 2006) (voir Figure III.2.5).

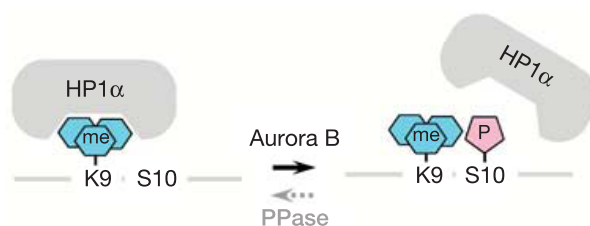


Figure III.2.5 : Rôle de la phosphorylation de H3S10 par Aurora B en prophase. La phosphorylation par Aurora B de la serine 10 de H3 provoque la déstabilisation de la liaison de HP1alpha avec la triméthylation de la lysine 9, et son retrait de la chromatine. (D'après Hirota et al 2005)

d) Implication du CPC dans la formation du fuseau mitotique

En prométaphase, le fuseau mitotique microtubulaire va se former autour de la chromatine condensée pour permettre la congression des chromosomes. Un gradient Ran-GTP permet alors la stabilisation et la nucléation des microtubules.

Le CPC permet à la fois la reconnaissance de la chromatine centromérique et des microtubules à travers l'interaction des domaines N-terminal et coil-coiled d'Incenp. Aurora B va être activée par ces deux structures, ainsi un rétrocontrôle positif sur la kinase se met en place (Tseng et al 2010; Kelly et al., 2007). Cette double détection de la chromatine et des microtubules est nécessaire pour que le fuseau se forme au niveau des centromères. Aurora B présente au niveau des centromères va phosphoryler les substrats liés aux microtubules (Tseng et al 2010), créant un gradient de substrats phosphorylés. Dans les extraits d'œuf de Xenope, Aurora B phosphoryle et inactive notamment la dépolymérase Op18/Stathmin (Gadea and Ruderman, 2006). De plus, le CPC est impliqué dans la stabilisation des microtubules induite par la chromatine de façon indépendante à Ran-GTP, en inhibant la fonction polymérisante de la kinésine MCAK (Sampath et al 2004).

Aurora B aurait aussi un rôle dans l'assemblage du kinétochore. En effet, la kinase phosphoryle hMis13 ce qui est essentiel pour le recrutement de Hec1/Ndc80 et de la kinésine CENPE (Yang et al., 2008). De plus, la phosphorylation de la Sérine 7 de CENPA, médiée par Aurora B, semble également impliquée dans le recrutement de CENPE au niveau des kinétochores (thèse de Damien Goutte-Gattat).

e) Implication du CPC dans la régulation du point de contrôle mitotique :

Au cours du processus de congression débutant en prométaphase, l'attachement des microtubules à la partie externe du kinétochore est un élément primordial dans la ségrégation des chromosomes. Un attachement défectueux peut entraîner des erreurs de ségrégation, pouvant aboutir à la cancérisation de la cellule par aneuploïdie. Différents types d'attachements incorrects peuvent survenir : les attachements mérotéliques, syntéliques ou monotéliques (voir Figure III.2.6). Les attachements mérotéliques peuvent être favorisés par l'orientation des chromosomes par rapport aux centrosomes. Ainsi un centromère perpendiculaire à l'axe interpolaire va favoriser la formation de kinétochores mérotéliques (Cimini 2003) (voir Figure III.2.7).

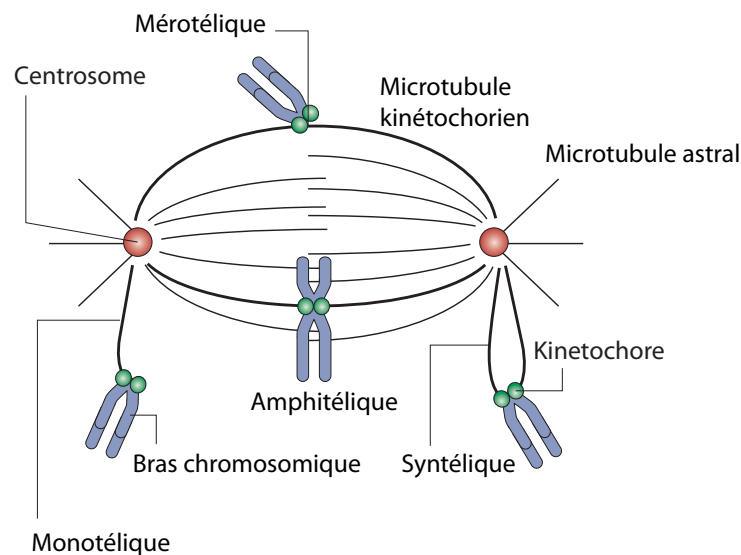


Figure III.2.6 : Différents types d'attachements des chromosomes au fuseau mitotique. Les microtubules kinétochoriens issus des centrosomes capturent les kinétochores et les relient aux deux pôles opposés de la cellule. L'attachement amphotélique conduit à une ségrégation équilibrée des chromosomes. Attachements mérotélique : un des deux kinétochores d'un même chromosome lie les microtubules provenant des deux centrosomes. Attachement monotélique : un des deux kinétochores d'un même chromosome lie les microtubules issus d'un même pôle. Attachement syntélique : les deux kinétochores d'un même chromosome lient les microtubules provenant d'un même centrosome. (D'après Keen and Taylor, 2004).

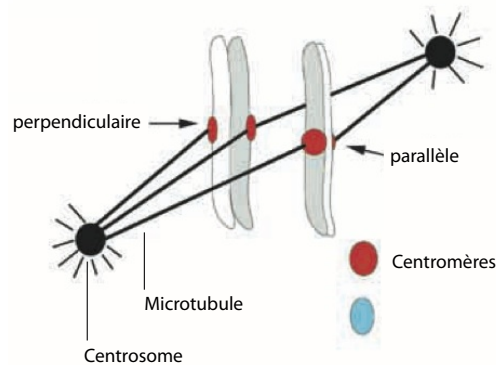


Figure III.2.7 : Une orientation perpendiculaire des kinétochores par rapport à l'axe interpolaire favorise la formation de kinétochore mérotélique. Un kinétochore placé de façon perpendiculaire à l'axe formé par les deux centrosomes va plus facilement lier à la fois les microtubules provenant des deux pôles de la cellule (D'après Cimini et al., 2006).

En présence de nocodazole ou taxol, les cellules restent bloquées en métaphase. Ces drogues ont respectivement pour effet de dépolymériser les microtubules et d'inhiber leur dépolymérisation. Dans un cas comme dans l'autre, le fuseau mitotique est perturbé ainsi que l'attachement microtubules/kinétochores. Il y a donc dans la cellule un processus responsable de cet arrêt. Chez la levure, un criblage des gènes impliqués dans le blocage en métaphase, suite à la présence de drogues perturbant le fuseau, a permis la mise en évidence des gènes MAD (mitotic arrest deficient) et des gènes BUB (budding uninhibited by benzimidazole) (Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991). Ces expériences montrent la présence d'un point de contrôle permettant à la cellule d'inhiber l'entrée en anaphase tant que tous les kinétochores ne sont pas correctement attachés. C'est le point de contrôle du fuseau mitotique ou « Spindle Assembly Checkpoint » (SAC) (Musacchio and Salmon, 2007).

Quels sont les mécanismes impliqués dans l'inhibition de l'entrée en anaphase ?

En métaphase, les chromatides sœurs sont reliées entre elles par un complexe de protéines : les cohésines. Pour permettre le passage en anaphase ces cohésines doivent être clivées par une protéase : la Séparase. Les protéines du SAC sont impliquées dans une voie de signalisation visant à réguler l'activité de la séparase. Ces protéines vont en effet séquestrer Cdc20, co-facteur de l'Ubiquitine ligase APC/C (Anaphase Promoting Complex/ Cyclosome) ce qui va inhiber son activité. Or, l'APC/C permet la polyubiquitination de la Sécurine et de la Cycline B, ce qui entraîne leur dégradation par le protéasome 26S. La Sécurine est un inhibiteur stœchiométrique de la Séparase, sa

dégradation médiée par l'APC/C provoque ainsi la libération de la Séparase et le clivage des cohésines (Musacchio and Salmon, 2007). Les chromatides sœurs peuvent alors ségréger aux pôles opposés de la cellule. De plus, la dégradation de la Cycline B par le protéasome 26S a pour conséquence l'inactivation de la kinase CDK1 ce qui favorise la sortie de mitose (Musacchio and Salmon, 2007; Keen and Taylor, 2004) (voir Figure III.2.8). L'association de la Séparase avec le chromosome mitotique serait régulée par Aurora B (Yuan et al 2008).

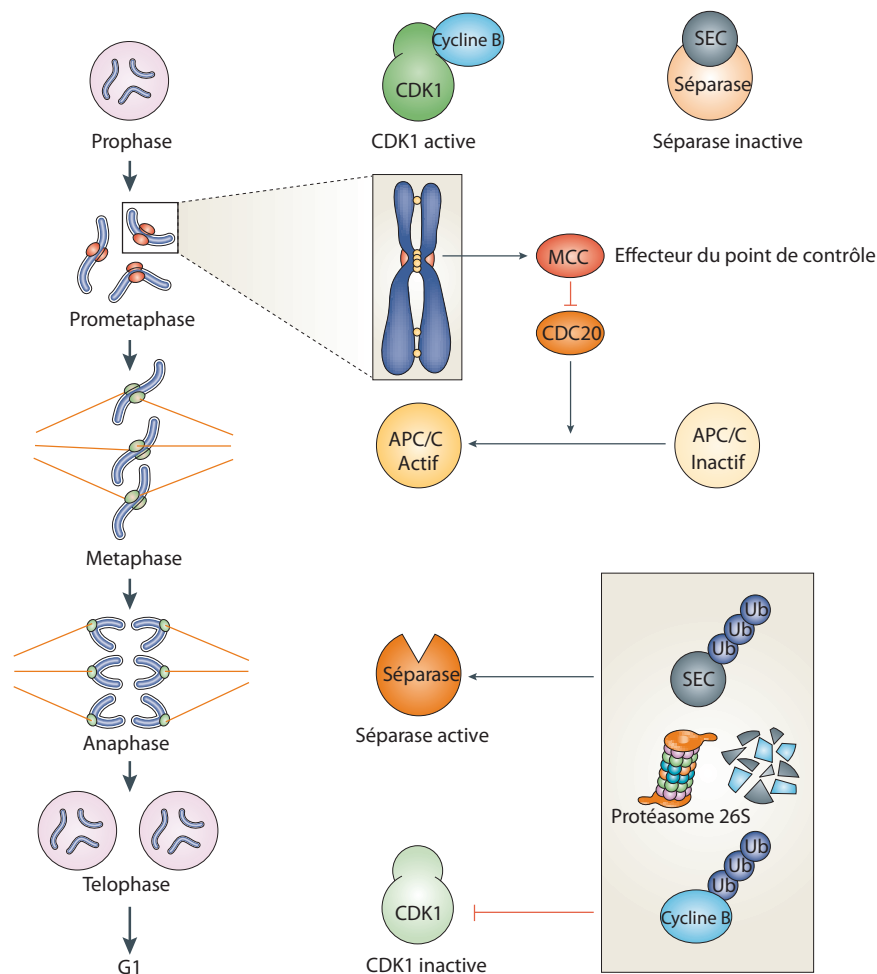


Figure III.2.8 : Inhibition de l'entrée en anaphase par les protéines du point de contrôle mitotique. La protéase Séparase est requise pour cliver les cohésines qui relient les chromatides sœurs entre elles, et donc pour l'entrée en anaphase. Tant que les chromosomes ne sont pas correctement alignés sur la plaque équatoriale, la Sécurine va lier et inactiver la Séparase. En prometaphase, le complexe MCC (Mitotic Checkpoint Complex) se forme au niveau des kinétochores. Celui-ci empêche l'activation par Cdc20 de l'APC/C (Anaphase-Promoting Complex/cyclosome). Après obtention de la bi-orientation des chromatides sœurs, le MCC lève son inhibition sur Cdc20, activant l'APC/C qui va ubiquitiner la cycline B et la Sécurine, provoquant leur dégradation par le protéasome. La séparase libérée clive les cohésines provoquant l'entrée en anaphase. (D'après Musacchio and Salmon, 2007).

Les protéines du SAC responsables de la séquestration de Cdc20 forment un complexe dénommé « Mitotic Checkpoint Complex » (MCC). Ces protéines sont MAD2, BUBR1, BUB3 et Cdc20 elle-même. Chacune des protéines du SAC se trouve à proximité des kinétochores en prométaphase, jusqu'à séparation des chromatides. Les kinétochores font office de plateforme pour catalyser la formation du complexe MCC qui, avec Cdc20, est localisé à ce niveau. D'autres kinases sont impliquées dans la régulation du point de contrôle mitotique. La kinase BUB1 phosphoryle Cdc20 pour la sensibiliser à sa fonction. Au niveau des kinétochores BUB1 est également impliquée dans le recrutement de nombreuses protéines, dont Aurora B et les kinésines MCAK et CENPE. La kinase MSP1 est aussi responsable du recrutement de CENPE, MAD1, MAD2 et PLK1. Très dynamique au niveau du kinétochore, MSP1 aurait un rôle régulateur des protéines dont elle permet le recrutement. (Musacchio and Salmon, 2007).

Comment sont attachés les kinétochores aux microtubules ?

Aurora B a un rôle de senseur de la tension lui permettant de détecter, puis corriger, les attachements défectueux entre microtubules et kinétochores. Plusieurs substrats kinétochoriens sont en effet la cible de la kinase.

La protéine HEC1/Ndc80 interagit avec la tubuline des microtubules kinétochoriens par la partie globulaire de sa queue N-terminale. Celle-ci contient un domaine d'homologie à la Calponine permettant l'interaction avec les microtubules. C'est une partie de la protéine fortement chargée positivement, ce qui explique en partie son affinité avec les microtubules riches en résidus chargés négativement (Cai et al., 2008) (voir Figure III.2.9). De nombreux sites de phosphorylation d'Aurora B sont présents sur cette queue N-terminale. L'ajout de groupements phosphates par la kinase diminue l'affinité de HEC1 avec les microtubules kinétochoriens ce qui participe à la déstabilisation de l'attachement des microtubules aux kinétochores (Sundin and Deluca, 2010; Musacchio and Salmon, 2007).

La kinésine MCAK est phosphorylée par Aurora B au niveau de son domaine d'interaction avec le centromère ce qui permet de localiser MCAK à ce niveau (Lan et al., 2004). Néanmoins la phosphorylation de la Serine 196 inhibe son activité dépolymérisante. MCAK existe sous forme phosphorylée et déphosphorylée à ce niveau : le renouvellement du phosphate est crucial dans la régulation de l'activité de MCAK (Lan et al., 2004).

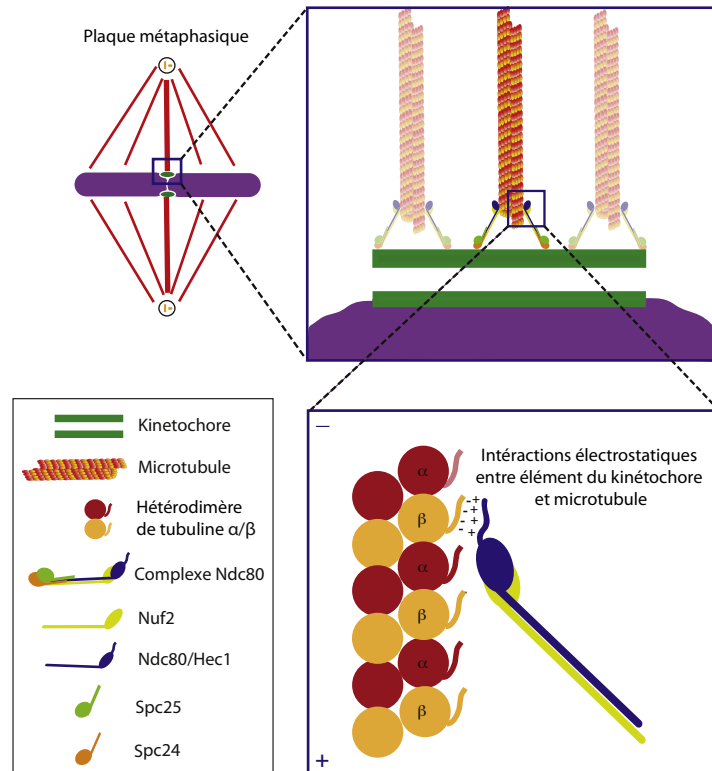


Figure III.2.9 : La queue N-terminale de Hec1/Ndc80 permet l'attachement des microtubules aux kinétochores. Les microtubules, composés de tubuline α et β , interagissent avec la plaque kinétochorienne, représentée en vert, par l'intermédiaire du complexe Hec1/Ndc80, composés des 4 sous-unités : Nuf2, Hec1/Ndc80, Spc25 et Spc24. L'interaction, de nature électrostatique, entre le complexe et les microtubules, a lieu entre l'extrémité N-terminale de Hec1/Ndc80, siège de son domaine d'homologie à la Calponine et chargée positivement, et la queue C-terminale de la tubuline β , chargée négativement. (D'après Cai and Walczak, 2008).

Comment est détectée la présence d'attachement défectueux?

Un seul chromosome non bi-orienté suffit à bloquer la poursuite de la mitose chez les vertébrés. Comment le SAC peut-il détecter ces erreurs d'attachement et quels sont les mécanismes responsables de la correction de ces erreurs ? Il existe une dualité entre d'un côté, l'absence de microtubules au niveau du kinétochore, et de l'autre, l'absence de tension mécanique provoquée par la bi-orientation des chromosomes. Les deux pouvant activer le point de contrôle mitotique et donc inhiber l'entrée en anaphase.

Hormis son rôle dans le complexe MCC, la protéine MAD2 induit la dépolymérisation des microtubules kinétochoriens. Son activité atteint son pic en

prométaphase et la protéine n'est quasiment plus détectable en métaphase (50 à 100x moins). La Dynéine présente au niveau des microtubules serait responsable du retrait de MAD2 des kinétochores attachés par le fuseau de microtubules, son activité étant stimulée par la forte concentration de microtubules. MAD2 permet ainsi au point de contrôle mitotique de détecter l'absence d'attachement au niveau des kinétochores, tout comme la protéine MAD1 avec laquelle MAD2 se dimérise. Par ailleurs, la kinase BUBR1 phosphoryle CENPE en prométaphase. Son homologue MAD3 chez la levure ne possède qu'un rôle structural. BUBR1 est activée par CENPE *in vitro*. Cette activation cesse quand CENPE interagit avec des microtubules, un autre moyen pour le SAC d'évaluer la présence d'attachement au niveau des kinétochores. De plus, lorsque peu de kinétochores présentent des attachements défectueux, CENPE serait importante pour amplifier la réponse du SAC.

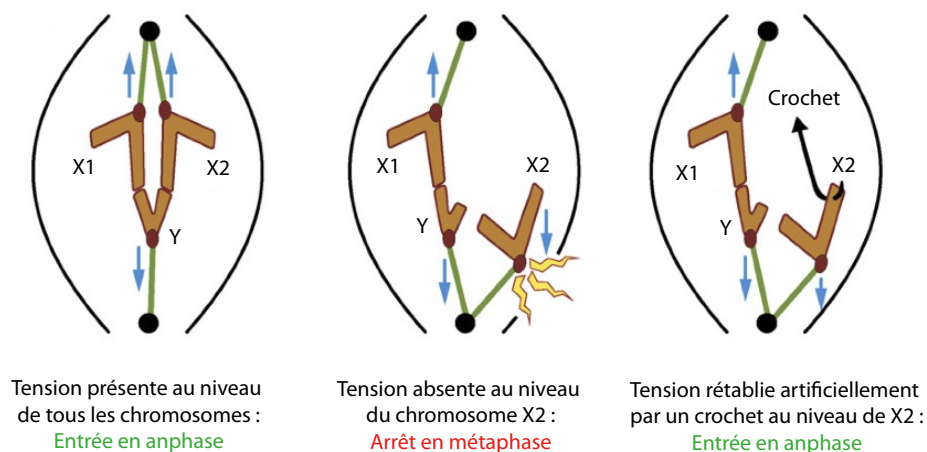


Figure III.1.10 : L'application de tension au niveau des kinétochores est suffisante pour désactiver le SAC. Expériences sur des méiose I de spermatocytes de Criquet, un trivalent de chromosomes X1, X2 et Y est représenté en marron clair, les kinétochores en bordeaux, les microtubules en vert et les centrosomes en noir. Dans le premier cas, les chromosomes sont correctement alignés, et une tension est présente au niveau des kinétochores ; le SAC satisfait permet l'entrée en anaphase. Dans le second cas, le chromosome X2 est inattaché, l'absence de tension résultante déclenche le point de contrôle mitotique ; il y a un arrêt en métaphase. Dans le dernier cas, un crochet permet de rétablir la tension au niveau du kinétochore du chromosome X2 ; le SAC est satisfait et la cellule entre en anaphase. (D'après Nezi and Musacchio, 2009).

Des expériences pionnières de micromanipulations de spermatocytes de Criquets en méiose I, réalisées dans les années 60, montrent l'importance de la tension mécanique dans la signalisation du SAC (Nicklas and Koch, 1969). De manière forcée, les chromosomes, attachés de façon monotéliques, sont capturés et tendus, à l'aide d'une

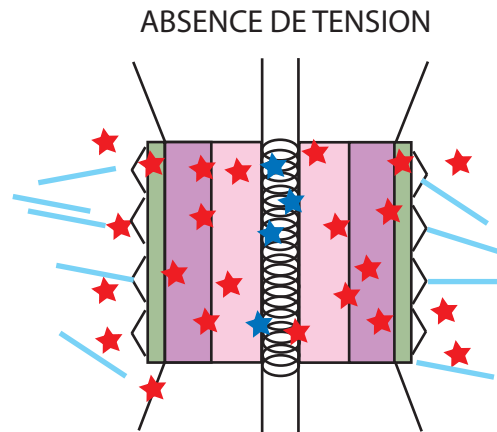
micro-aiguille, vers le pôle opposé de la cellule. L'application de cette force stabilise les attachements entre microtubules et kinétochore par simple tension mécanique, et le SAC lève son inhibition sur l'entrée en anaphase (voir Figure I.1.10). Aurora B est le composant du point de contrôle mitotique responsable de la détection de la tension.

Dans des cellules diploïdes normales, la réponse du SAC aux problèmes d'attachement est plus robuste, Aurora B est enrichie au niveau des chromosomes mal alignés (Salimian et al 2011). De plus, l'arrêt en métaphase, en présence de faibles doses de taxol, est supprimé en présence d'inhibiteur d'Aurora B (Ditchfield et al., 2003). En effet, les protéines du SAC ne détectent pas les attachements mérotéliques responsables des chromosomes traînants. En effet, la fréquence de chromosomes trainants en anaphase est augmentée en cas d'inhibition partielle d'Aurora B (Cimini et al., 2006). Aurora B recrute MCAK au niveau des kinetochores merotéliques (Knowlton et al., 2006). La kinase permet donc au point de contrôle mitotique d'être activé en présence de tels attachements.

Comment Aurora B détecte-t-elle l'absence de tension au niveau du kinétochore ?

Le CPC est localisé au niveau de la partie interne des centromères dès la prométaphase et jusqu'à l'entrée en anaphase. En absence de tension, lorsque les kinétochores ne sont pas correctement attachés par le fuseau microtubulaire, les substrats kinétochoriens d'Aurora B sont spatialement proches de la partie interne du centromère et peuvent être phosphorylés par la kinase. En présence de tension inter- et intra-kinétochorienne, les substrats kinétochoriens s'éloignent de la partie interne du centromère, et ne sont plus à portée d'Aurora B. Les attachements sont alors stabilisés par la présence de tension. Une étude par FRET montre l'importance de l'interaction spatiale entre Aurora B et ses substrats (Liu et al., 2009). Les condensines centromériques sont des éléments essentiels dans le maintien des centromères durant la détection des attachements défectueux par Aurora B, au cours du point de contrôle mitotique (Samoshkin et al., 2009). L'activité kinase d'Aurora B est stimulée à la fois par les microtubules et la chromatine. Dans un modèle récemment proposé, la tension au niveau des centromères joue sur l'accessibilité de la chromatine et des microtubules à Aurora B, et par conséquent sur le niveau d'activation de la kinase (Kelly and Funabiki, 2009) (voir Figure III.1.11).

A) Attachement incorrect : kinétochores monotéliques, syntéliques ou mérotéliques



B) Attachement correct : kinétochores amphitéliques

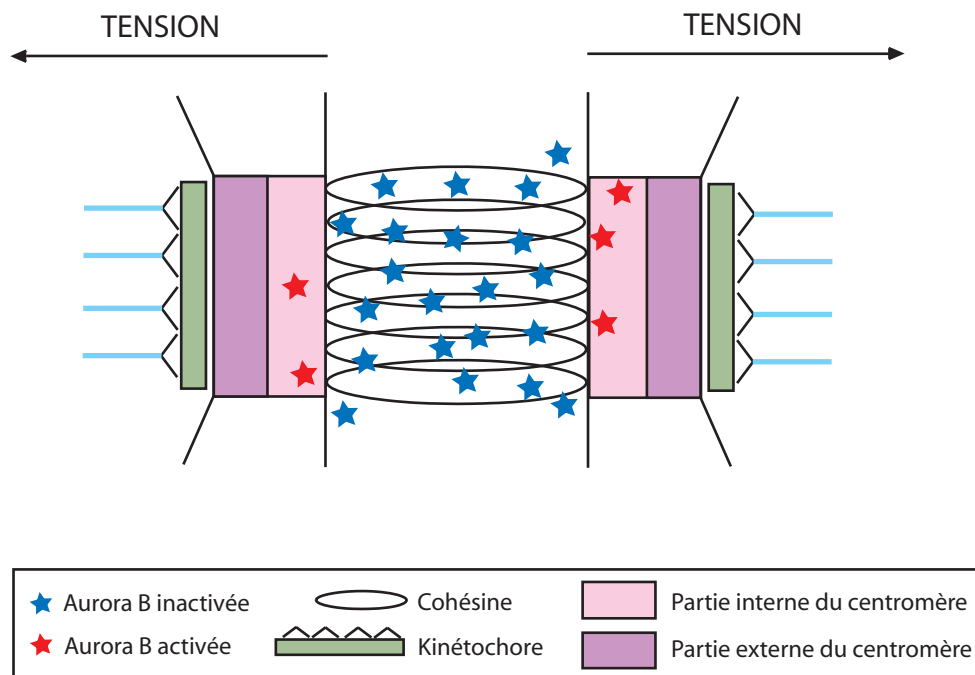


Figure III.1.11 : Modèles de détection de la tension par Aurora B. La détection de la présence ou absence de tension par Aurora B est principalement basée sur l'éloignement spatial de la kinase et de ses substrats. Dans la situation A, Aurora B est activée par la chromatine et ses substrats kinétochoriens. Les attachements sont alors déstabilisés. Dans la situation B, la tension éloigne la chromatine et les kinétochores de la kinase. L'attachement est stabilisé.

Comment le SAC est-il déclenché par un kinétochore incorrectement attaché ?

Plusieurs modèles de régulation existent, opposant la dualité entre tension mécanique et présence d'un attachement (voir Figure III.1.12). Dans le premier modèle, l'absence de tension détectée par Aurora B va provoquer la destruction médiée par la kinase de l'attachement inapproprié. L'absence d'attachement sera alors détectée par la machinerie du SAC sensible à la présence d'attachement, MAD 2 notamment, et l'entrée en anaphase sera inhibée. Dans le second modèle, les machineries sensibles à l'absence de tension et à l'absence d'attachement sont deux voies co-existantes pouvant directement activer le point de contrôle mitotique. Dans le dernier modèle, seule la tension comme mode de détection d'erreurs d'attachement est responsable de l'arrêt en métaphase (Musacchio, 2010a).

De plus en plus d'indications impliquant Aurora B directement dans les voies de signalisation du SAC s'accumulent. Aurora B permet notamment le recrutement d'autres protéines du SAC, telles que BUB1, BUBR1, Mad 2, CENPE et Msp1. En effet, la localisation au niveau du kinétochore de Bub1, BubR1, Mad2 et CENPE, diminue en présence d'inhibiteurs dirigés contre Aurora B (Ditchfield et al., 2003; Hauf et al., 2003). De même, si Aurora B est délocalisée à l'aide d'Actinomycin D, intercalant de l'ADN supposé provoquer un changement de topologie de l'ADN centromérique, la localisation de Bub1 et BubR1 est rapidement perdue. Ce phénotype n'est pas visible en présence d'une fusion Incenp-CENPB, relocalisant le CPC au niveau des centromères (Becker et al 2010). En absence de délocalisation du CPC des centromères en anaphase, Bub1, BubR1 et Msp1 sont à nouveau recrutées au niveau des kinétochores (Vazquez-Novelle and Petronczki, 2010). Aurora B serait aussi importante dans la formation du SAC et l'amplification de son signal. Si l'activité d'Aurora B est supprimée, le complexe Mad1-Mad2 ne se localise pas au niveau des kinétochores. BubR1 est phosphorylée par Aurora B et Msp1 ce qui semble favoriser la formation du MCC dont BubR1 fait partie (Maresca 2011).

Comment le point de contrôle mitotique est-il éteint permettant le passage en anaphase ?

La déphosphorylation des substrats kinétochoriens d'Aurora B est nécessaire à la stabilisation des attachements amphitéliques et l'entrée en anaphase. Chez *S.cerevisiae*,

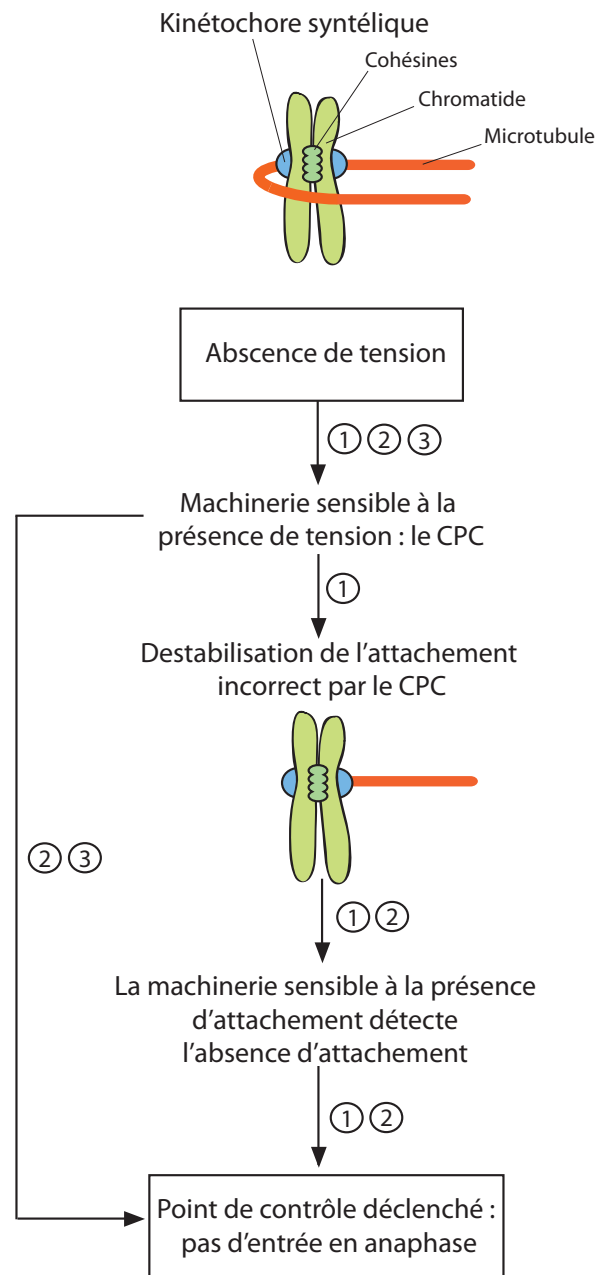


Figure III.1.12 : Dualité tension vs attachement dans l'activation du SAC. En présence d'un attachement incorrect le point de contrôle du fuseau mitotique est déclenché. Trois modèles possibles ont été proposé par Musacchio, 2010a. 1) L'absence de tension du à un attachement incorrect va activer la machinerie sensible à l'absence de tension, à savoir le CPC. Son activité déstabilisatrice des attachements va permettre le retrait des microtubules mal attachés. L'absence d'attachement va activer la machinerie sensible à l'absence d'attachement qui va elle-même activer le SAC. 2) Dans ce second modèle, deux voies indépendantes vont activer le SAC, une faisant appel à la machinerie sensible à l'absence de tension et l'autre à celle sensible à l'absence d'attachement. 3) Uniquement la machinerie sensible à l'absence de tension , le CPC, va activer le SAC en cas de kinétochore non-amphitélétique.

la déphosphorylation de Dam1 (formant un anneau autour des microtubules et pouvant être assimilé au réseau KMN) va être responsable de la stabilisation des attachements (Keating et al 2009). Chez les vertébrés, le complexe KNL1 (composant du KMN) interagit avec la phosphatase PP1 et la recrute au niveau de la partie externe du kinétochore. PP1 déphosphoryle les substrats d'Aurora B et stabilise les attachements kinétochores-microtubules. La phosphorylation de KNL1 par Aurora B perturbe son interaction avec PP1 ; C'est un rétro-contrôle positif d'Aurora B (Liu et al 2010). L'inactivation d'Aurora B au niveau des kinétochores amphitéliques va permettre aux substrats d'Aurora B de rester dans un état déphosphorylé. Mst1 (mammalian stérile 20-like kinase 1) phosphoryle Aurora B *in vitro* ce qui inhibe son activité. En cas d'inhibition de Mst1, l'activité d'Aurora B augmente, de la même façon, une co-extinction des deux kinases stabilise les attachements (Oh et al 2010).

Chez la *Drosophile*, en cas d'activation ectopique d'une protéase pouvant cliver les cohesines, le SAC reste actif. Cependant, CDK1 est toujours présent ainsi que Mad1 et Mad2. Si cdc14, phosphatase responsable de la relocalisation du CPC, est inactivée et les cohésines clivées artificiellement, ou en présence de Cycline B non-dégradable, le point de contrôle reste actif (Vazquez-Novelle and Mirchenko, 2010). Cela indique que l'inactivation du point de contrôle ne dépend pas uniquement de la stabilisation des attachements amphitéliques. La clairance des protéines du SAC, qui dépend, en partie, de l'inactivation de CDK1, est aussi essentielle pour éteindre le SAC.

En effet, le retrait des centromères des éléments impliqués dans le point de contrôle mitotique semble permettre son extinction et le passage en anaphase. Le retrait du CPC des centromères est médiée par la kinésine MKLP2 et va de même permettre la stabilisation des attachements. La Dynéine serait responsable de la majeure partie du retrait des autres composants du SAC. Aurora B phosphoryle Zwint-1 ce qui permet le recrutement d'autres éléments du kinétochore. Sa déphosphorylation en métaphase est nécessaire pour la clairance des éléments du SAC médiée par la Dynéine (Kasuboski et al 2011). En outre, l'inhibition d'Aurora B diminue l'accumulation de la Dynéine au niveau des kinétochores ce favorisant la clairance des éléments du SAC. En présence de faibles doses de taxol, les attachements kinétochores/microtubules sont stabilisés. La présence d'une Aurora B active permet alors d'avoir des éléments du SAC toujours présents au niveau des attachements incorrects, et un point de contrôle actif.

III.2 CPC et Cytodiérèse

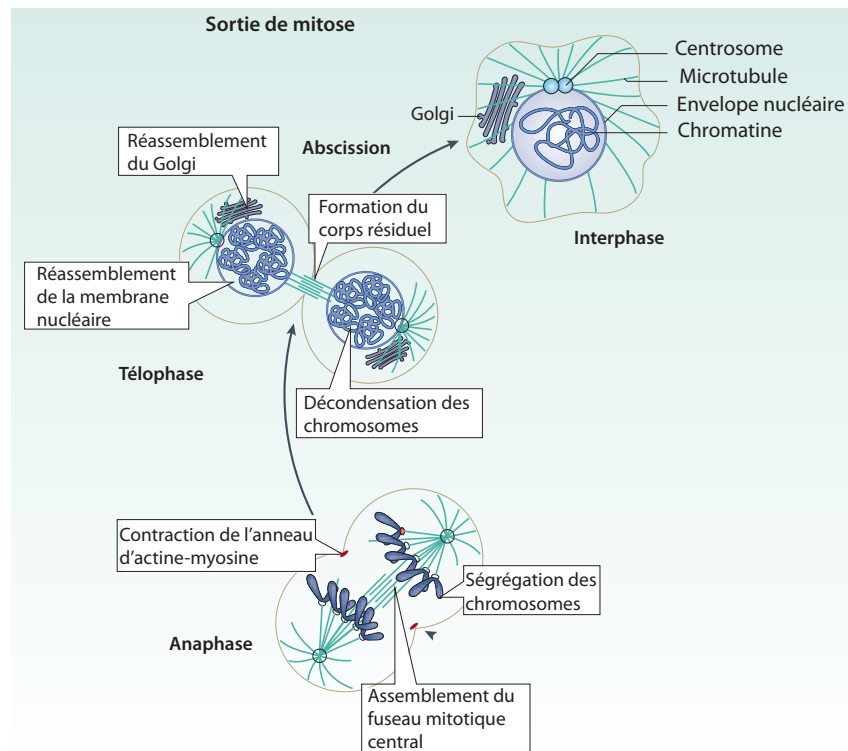


Figure III.2.1 : Schéma représentant les grandes étapes de la cytokinèse. A l'entrée en anaphase les chromosomes ségrègent, le fuseau central s'assemble, tout comme l'anneau contractile d'actine-myosine, qui se contracte pour former, en télophase, le corps résiduel. La membrane nucléaire se reforme et les chromosomes se décondensent, puis l'étape d'abscission a lieu, aboutissant à deux cellules filles. (D'après Wurzenberger and Gerlich, 2011).

a) Relocalisation du CPC

Après la résolution du point de contrôle mitotique, les chromatides sœurs se séparent. Le CPC est alors relocalisé sur le fuseau de microtubules au niveau du sillon de division. Deux éléments principaux sont impliqués dans cette dynamique.

La relocalisation semble d'une part médiée par la kinésine Mklp2, membre de la famille des moteurs moléculaires kinésine 6 microtubules-dépendants (qui peuvent se fixer et se déplacer sur les microtubules). En effet, en l'absence de Mklp2, le CPC reste positionné sur les centromères en anaphase, avant de perdre toute localisation (Gruneberg et al., 2004). Un tel phénotype n'est pas observé pour la kinésine mitotique MKLP1, substrat d'Aurora B. Chez *C-elegans* l'absence de ZEN-4, homologue unique de MKLP1 et MKLP2, est aussi liée à un défaut de relocalisation du CPC (Li et al., 2004). De

plus, l'interaction entre Aurora B et MKLP2 a été mise en évidence par des expériences de double hybride (Gruneberg et al., 2004). L'interaction de Mad 2 avec MKLP2, en modifiant son repliement, prévient la liaison de MKLP2 avec le fuseau central, ce qui inhibe la relocalisation du CPC en début de mitose (Lee et al., 2010). La kinase Plk1 (Polo-like kinase 1) phosphoryle MKLP2 permettant la relocalisation des deux protéines au niveau du sillon de division. De même cette phosphorylation est nécessaire pour la relocalisation du CPC (Nakajima et al., 2011; Neef et al., 2003).

La relocalisation du complexe est soumise d'autre part, à la régulation de la kinase CDK1 et de la phosphatase Cdc14. En début de mitose, CDK1 phosphoryle INCENP au niveau de sa Tyrosine 59, cela empêcherait le complexe d'être délocalisé des centromères. Un mutant INCENP T59E séquestre le CPC au niveau des centromères en anaphase (Vazquez-Novelle and Petronczki, 2010). Cdc14, en déphosphorylant INCENP, permettrait la levée de l'inhibition de la relocalisation. De plus, Cdc14 est un partenaire de MKLP2 (Gruneberg et al., 2004). Chez la levure, Cdc14 est relâchée par la Séparase Esp1 pour déphosphoryler INCENP/Sli15 (Pereira and Schiebel, 2003).

b) Mécanisme général de la Cytokinèse

La cytokinèse consiste en la séparation physique du cytoplasme d'une cellule en deux cellules distinctes. Elle débute en anaphase, quand le sillon de division commence son ingression sur un plan perpendiculaire à celui du fuseau central. Une vingtaine de protéines sont impliquées dans la cytokinèse de la plupart des cellules animales. La cytokinèse se déroule à plusieurs niveaux (Glotzer, 2005) :

- Au niveau du fuseau central ;
- De la voie de signalisation RhoA ;
- De l'anneau contractile d'actine-myosine ;
- Des vésicules membranaires impliquées dans la formation de la membrane au niveau du sillon de division.

Le fuseau central est formé par des protéines régulatrices de la cytokinèse, positionnées au niveau du futur site de clivage, ainsi que d'un réseau de microtubules

antiparallèles se chevauchant. Ces microtubules polymérisent entre les deux lots de chromosomes ségrégés. Le fuseau central permet le recrutement des éléments régulateurs de la cytokinèse et l'élargissement de la cellule en anaphase (Glotzer, 2005).

L'anneau contractile est formé par un réseau de filaments d'actines et de myosines non-musculaires de type II, où réside l'activité motrice. En effet, la myosine se déplace sur l'actine, ce qui permet le raccourcissement de l'anneau contractile. Le mécanisme est semblable à celui des fibres musculaires, mis à part la dissociation des filaments au fur et à mesure. La position de l'anneau contractile est déterminée par le fuseau central, et est finement régulée pour permettre la coordination entre la ségrégation du matériel génétique et la cytokinèse proprement dite (Glotzer, 2005). L'anneau contractile est rattaché à la membrane plasmique par des filaments de septines, ce sont des hétéro-oligomères de protéines liants le GTP. La liaison entre l'actine-myosine et la Septine est médiée par une protéine : l'Anilline, un adaptateur qui interagit avec chacun de ces éléments, ainsi qu'avec les microtubules du fuseau central (voir Figure III.2.2) (D'Avino, 2009; Kinoshita et al., 2002; Piekny and Glotzer, 2008).

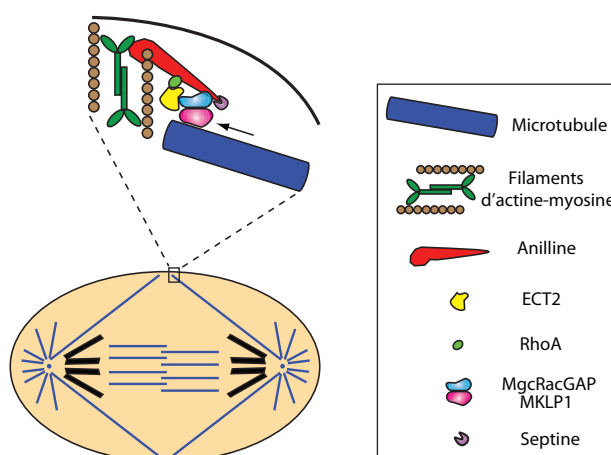


Figure III.2.2 : Rôle charnière de la Septine et l'Anilline dans la liaison entre fuseau mitotique et anneau contractile. Les microtubules et éléments régulateurs du fuseau mitotique se lie à l'Anilline et la Septine. L'Anilline va aussi interagir avec les filaments d'actine-myosine. (D'après D'Avino, 2009).

RhoA est une guanosine triphosphatase, sa voie de signalisation permet l'assemblage de l'anneau contractile. En effet, Rho A induit la nucléation de l'actine et active la myosine (D'Avino, 2009; Yuce et al., 2005).

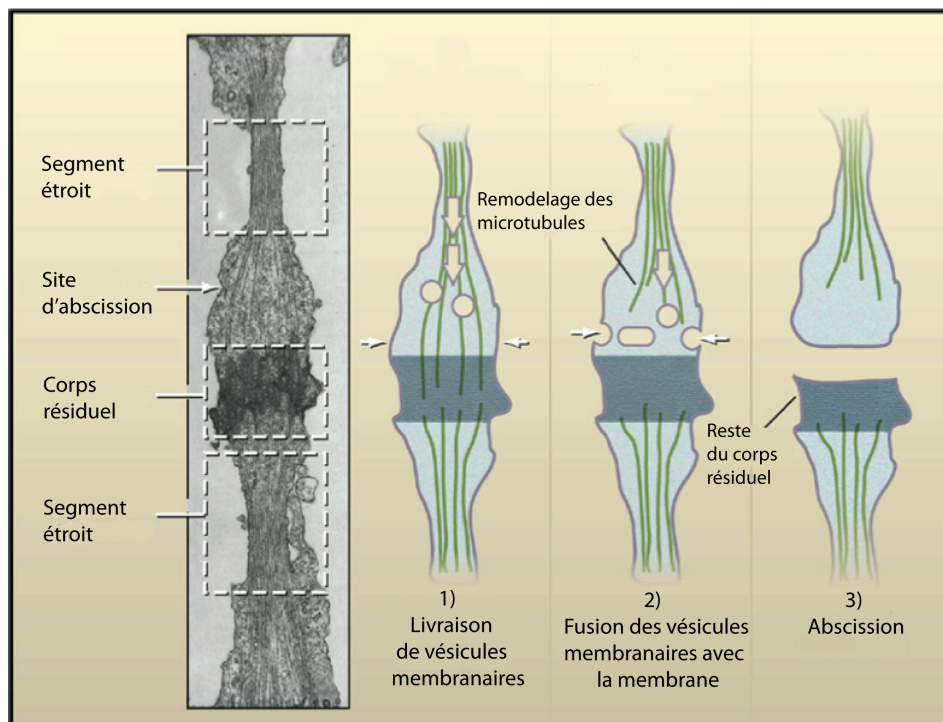


Figure III.2.3 : Rôle des vésicules membranaires dans l'abscission. Le cliché de Microscopie électronique montre le pont intercellulaire et le corps résiduel, plus dense. Au niveau du segment étroit, les microtubules sont contigus à la membrane plasmique, puis s'élargissent au contact du corps résiduel. D'un côté du corps résiduel se situe le site d'abscission, qui est un processus asymétrique. Un modèle de transport membranaire pendant la cytokinèse est représenté schématiquement. 1) En fin de télophase les vésicules membranaires, issues de l'appareil de Golgi ou de vésicules d'endocytoses, sont délivrées le long des microtubules au pont intercellulaire ; 2) les microtubules sont retirés du site d'abscission où les vésicules membranaires fusionnent avec la membrane plasmique ; 3) lorsque l'espace est rempli par les membranes, l'abscission a lieu. Le complexe ESCRT est impliqué dans cette dernière étape (D'après Barr and Gruneberg, 2007).

Le sillon de division donne naissance au corps résiduel en télophase. Celui-ci, composé des protéines résiduelles du sillon de division, va servir de plateforme de recrutement pour les effecteurs de l'abscission : étape finale de la cytokinèse. Les mécanismes impliqués dans l'abscission font appel au tri et au transport des vésicules membranaires. Ces processus n'interviennent que dans les étapes tardives de la cytokinèse, après que les microtubules du fuseau central soient remodelés (voir Figure III.2.3).

Quels sont les éléments impliqués ? Dans les cellules animales, les mécanismes d'endocytose faisant intervenir la Clathrine, protéine constituant l'enveloppe des

vésicules membranaires, sont impliqués. De plus la dynamique de l'actine au niveau de la membrane plasmique jouerait un rôle dans le transport de membranes endocytées. Les composants de la machinerie ESCRT (**E**ndosomal **S**orting **C**omplex **R**equired for **T**ransport) responsable du tri des endosomes, sont également impliqués. Ceux-ci s'assemblent dans les membranes endosomales et leur permettent de s'invaginer, puis de former une vésicule. Les protéines du complexe ESCRT : ALIX et TSG101, interagissent avec la protéine du corps résiduel CEP55. Cela pourrait permettre de remodeler la membrane plasmique et promouvoir l'abscission (Barr and Gruneberg, 2007).

c) Implication des éléments régulateurs du fuseau central dans la cytokinèse

L'assemblage du fuseau central commence par la polymérisation de microtubules antiparallèles non kinétochoriens qui, plus tard mûriront en corps résiduel. La stabilité du fuseau central dépend de la présence d'éléments régulateurs constitués par trois principaux complexes protéiques : le complexe des protéines passagères, le complexe Centralspindline, et le complexe des protéines associées aux microtubules (complexe MAP)(Glotzer, 2005). Le complexe Centralspindline est un hétérotétramère composé d'un homodimère de kinésines MKLP1, membres de la famille des kinésines 6, et de deux protéines MgcRacGAP, qui ont une activité GTPase activatrice pour la famille des Rho GTPase (Pavicic-Kaltenbrunner et al., 2007). Le complexe MAP est composé par PRC1 (Protein Regulator of Cytokinesis 1), une protéine permettant la polymérisation des microtubules, et par KIF4, membre de la famille des kinésines 4 permettant de localiser et réguler PRC1 au niveau du fuseau central en anaphase(Glotzer, 2005, 2009). En métaphase, le complexe CdK1/Cyclin B phosphoryle MKLP1, PRC1 et Incenp pour éviter leur localisation au niveau du fuseau central (Glotzer, 2005 ; Vazquez-Novelle and Petronczki, 2010).

L'activation du complexe Centralspindline a lieu en début d'anaphase. Chez la drosophile en l'absence de MKLP1 il n'y a pas de formation d'anneau contractile (Adams et al., 1998). De même, dans les cellules HeLa, il n'y a pas de formation de corps résiduel si l'expression de MKLP1 est abolie par interférence ARN (Zhu et al., 2005). MKLP1 permettrait de stabiliser le corps résiduel jusqu'à ce que les membranes se séparent

(Guse et al., 2005). Le complexe Centralspindline permet l'accumulation de RhoA au niveau du cortex sur la zone d'ingression (Yuce et al., 2005). De plus ce complexe permettrait le recrutement d'Ect2 au niveau du fuseau central (Lewellyn et al., 2011; Yuce et al., 2005), une protéine à activité GTP exchange factor qui est impliquée dans la régulation de RhoA (D'Avino, 2009). MgcRacGAP, en particulier, permettrait d'inactiver RhoA au niveau du corps résiduel, son inactivation semblant requise pendant les phases tardives de la cytokinèse (Glotzer, 2009).

Le CPC est impliqué dans l'assemblage et le clivage du fuseau central (Yuce et al., 2005). Il est nécessaire pour le recrutement du complexe Centralspindline au niveau du fuseau central (Glotzer, 2005). En effet, Aurora B phosphoryle MKLP1 sur sa serine 708, et cette phosphorylation est nécessaire à la localisation de MKLP1 (Guse et al., 2005). Il a été démontré dans les cellules HeLa qu'Incenp permet le recrutement de MKLP1 au niveau du corps résiduel (Zhu et al., 2005). En outre, chez la Drosophile, Survivine permet la localisation de Rho au niveau du cortex équatorial dans les spermatocytes, et est requise pour une constriction correcte de l'anneau contractile d'Actine/Myosine (Szafer-Glusman et al., 2011). Pendant la cytokinèse Aurora B phosphoryle également MgcRacGAP sur sa serine 387, ce qui stimule sa fonction activatrice de GTPase, impliquée dans la régulation de RhoA (Minoshima et al., 2003). Une étude récente des partenaires d'Aurora B par méthode SILAC (Stable Isotope Labelling by an Amino Acid in Cell culture) a mis en évidence plusieurs substrats spécifiques de la cytokinèse, tels que PRC1, KIF4, Actine et Myosine (Ozlu et al., 2010). Cela suggère qu'Aurora B est aussi impliquée dans la régulation des éléments composant l'anneau contractile.

De plus, Aurora B participe à la formation du fuseau central en apportant une information spatiale (Fuller et al., 2008), et en favorisant la stabilisation des éléments qui le composent (Glotzer, 2009; Murata-Hori et al., 2002) (voir Figure III.2.4). Tout d'abord, en début d'anaphase, Aurora B est relocalisée au niveau de sous-groupes de microtubules du fuseau central, entre les chromosomes ségrégant. Cela a pour conséquence l'activation de la kinase par autophosphorylation au contact des microtubules, et le réarrangement de ceux-ci (Fuller et al., 2008). Aurora B atteint alors son pic d'activité au cours de la mitose (Fuller et al., 2008; Ruchaud et al., 2007). La présence de phosphatases cytosoliques, désactivatrices d'Aurora B, de part et d'autre

des microtubules activateurs, va aboutir à la formation d'un gradient d'activité de la kinase. Ce gradient de marques post-traductionnelles apporte des informations spatiales pour la mise en place du futur sillon de division (Fuller et al., 2008). En outre, Aurora B et la protéine 14-3-3, stabilise le complexe Centralspindline en favorisant sa multimérisation au niveau du fuseau central (Douglas et al., 2010). Cependant, il a été récemment proposé chez la levure un rôle d'autophosphorylation du CPC sur sli15/Incenp. Une telle phosphorylation permettrait de réguler la liaison du CPC avec les microtubules, à l'instar de CDK1, en ajoutant des charges négatives sur Sli15/Incenp. Au niveau du fuseau central cela pourrait permettre, au contraire, d'éviter la polymérisation excessive des microtubules (Nakajima et al., 2011).

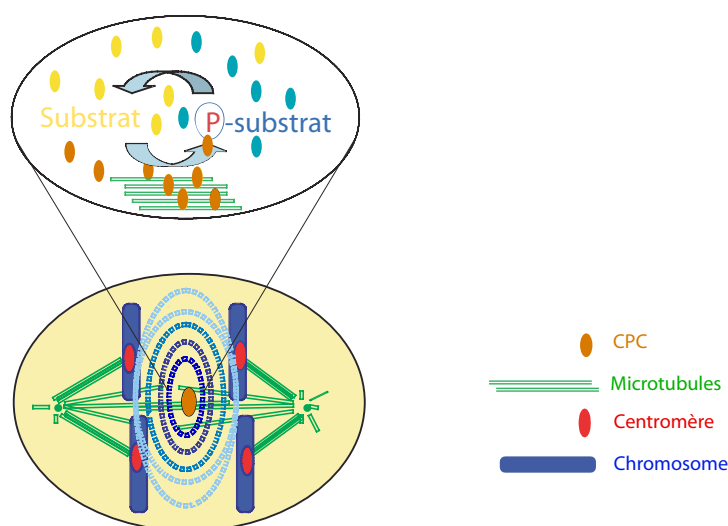


Figure III.2.4: Un gradient d'activité de Aurora B en début d'anaphase apporte des informations spatiales pour la formation du fuseau central. La relocalisation du CPC au niveau des microtubules du fuseau central en début d'anaphase provoque la formation d'un gradient d'activité de Aurora B. Les substrats, éléments régulateurs du fuseau central, vont être phosphorylés au contact de Aurora B puis déphosphorylés par des phosphatases cytosoliques. Ainsi les seuls substrats présents au niveau du fuseau central seront phosphorylés, apportant une information spatiale. (D'après Fuller et al., 2008).

Chez *C-elegans*, l'inhibition conjointe du CPC et du complexe Centralspindline aboutit à un défaut de constriction plus sévère qu'en cas d'inhibition unique de l'un ou l'autre (Lewellyn et al., 2011). Le CPC aurait donc un rôle indépendant de celui qu'il exerce sur le complexe Centralspindline. Une hypothèse avancée est que le CPC permettrait la réorganisation des filaments de Septines, dont la polymérisation est

contrôlée par phosphorylation chez la levure, ce qui faciliterait la constriction (Lewellyn et al., 2011).

En anaphase-télophase, Aurora B phosphoryle les filaments intermédiaires sur plusieurs sites. Notamment la serine 72 des Vimentines, composants les plus communs des filaments intermédiaires, qui participent à la formation des lamines de la membrane nucléaire (Ozlu et al., 2010; Goto et al., 2003). De même la kinase phosphoryle les filaments intermédiaires de type III ; Desmin et GFAP (Glial fibrillary acid protein) (Kawajiri et al., 2003). Cette phosphorylation permet la désagrégation des filaments et leur ségrégation dans les deux cellules filles.

d) Rôle d'Aurora B dans le point de contrôle de l'abscission

Récemment un nouveau rôle pour Aurora B a été proposé dans le point de contrôle de l'abscission. L'abscission consiste en la séparation de la membrane plasmique permettant la jonction entre deux cellules filles, c'est la dernière étape de la cytokinèse. Des anomalies génomiques, telles que l'aneuploïdie, sont souvent liées à une progression cancéreuse et peuvent être dues à un défaut d'abscission (Fujiwara et al., 2005). En effet, la régression du sillon de division, en cas d'échec de la cytokinèse, aboutit à la tétraploidisation de la cellule. Elle est observée notamment en présence de ponts chromatinien au niveau du corps résiduel. Ceux-ci se forment lorsqu'il y a apparition de chromosomes dits « retardés » ou « traînants » en anaphase. L'apparition de telles structures peut être due à des problèmes au niveau des télomères, à des cassures au niveau de l'ADN, à une décaténation anormale des chromosomes ou lorsque le point de contrôle mitotique est court-circuité.

Le point de contrôle de l'abscission a tout d'abord été mis en évidence chez *S.Cerevisiae*, avec la voie de signalisation « No Cut » (pas de coupure). Les protéines Boi1 et Boi2, similaires aux Anillines, sont les protéines effectrices de cette voie. Les Anillines sont des protéines permettant la liaison entre les microtubules du fuseau mitotique et l'anneau contractile d'Actine-Myosine (D'Avino, 2009). Leur présence au niveau de l'étranglement du bourgeon résiduel inhibe l'activité des septines, effectrices de l'abscission, et serait dépendante de l'activité d'Ipl1, l'homologue levure d'Aurora B.

Dans ce modèle, l'abscission est retardée tant que les chromosomes ne sont pas correctement ségrégés (Norden et al., 2006). Ipl1 aurait un rôle de « senseur » lui permettant de détecter la présence de chromatine au niveau du sillon de division. En effet, la présence de chromosomes « traînants » en l'absence de défaut du fuseau mitotique est suffisante pour déclencher la voie de signalisation « No Cut ». L'acétylation de la chromatine par l'enzyme Ahc1 semble jouer un rôle dans la détection des chromosomes par Ipl1/Aurora B (Mendoza et al., 2009) (voir Figure III.2.5).

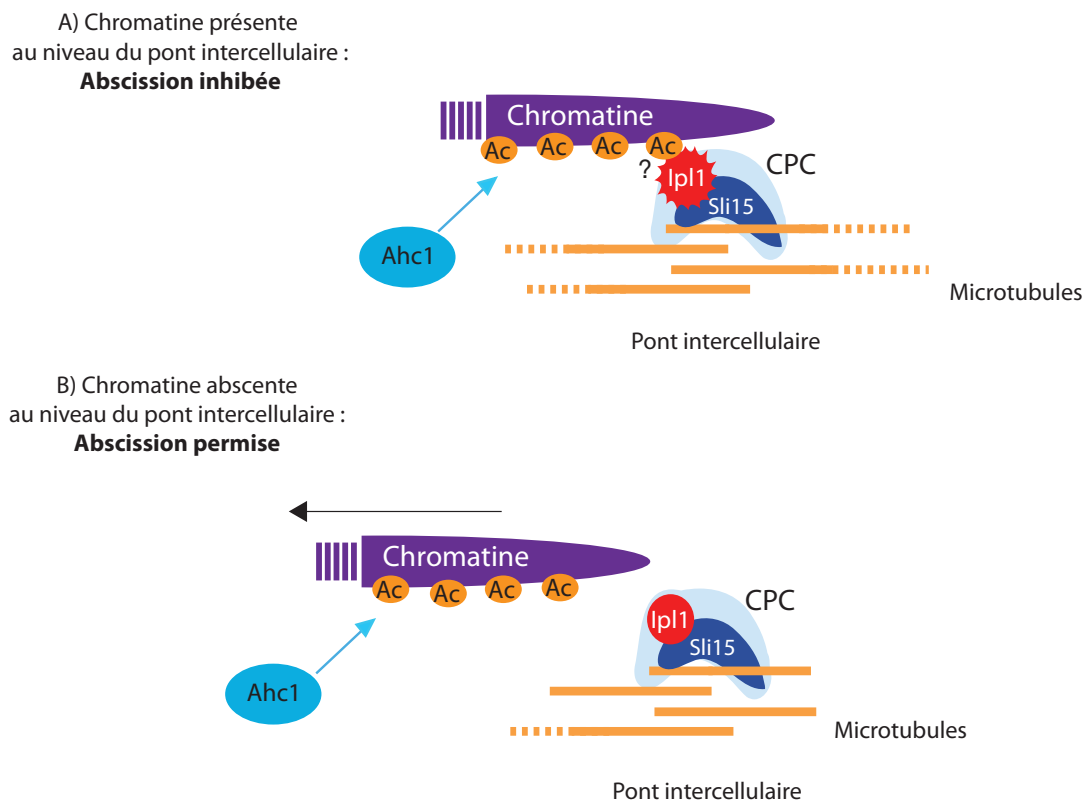


Figure III.2.5 : Rôle de Ipl1/Aurora B dans la voie de signalisation « No Cut ». La présence de chromatine acétylée par Ahc1 est détectée par Aurora B/Ipl1 au niveau du corps résiduel et provoque l'inhibition de l'abscission. Celle-ci sera permise en absence de chromatine. (D'après Mendoza et al., 2009).

La relocalisation d'Ipl1 au niveau du sillon de division en anaphase permettrait son éloignement de la chromatine, menant à son inactivation au niveau de l'étranglement en télophase, ce qui provoque la délocalisation de Boi1 et Boi2 du cortex. Celles-ci ne sont alors plus en mesure d'inhiber l'activité des septines, et l'abscission a lieu. Lorsque des défauts du fuseau mitotique sont présents, Ipl1/Aurora B ne se relocalise pas, reste au niveau de la chromatine, toujours active, et la voie de signalisation « No Cut » inhibe l'abscission (voir Figure III.2.6). Il n'est pas encore établi si Ipl1/Aurora B phosphoryle directement Boi1 et Boi2 ou, s'il existe des substrats intermédiaires. Ici « No Cut » permet d'éviter d'éventuelles cassures au niveau de l'ADN dues à une abscission précoce (Mendoza et al., 2009; Norden et al., 2006).

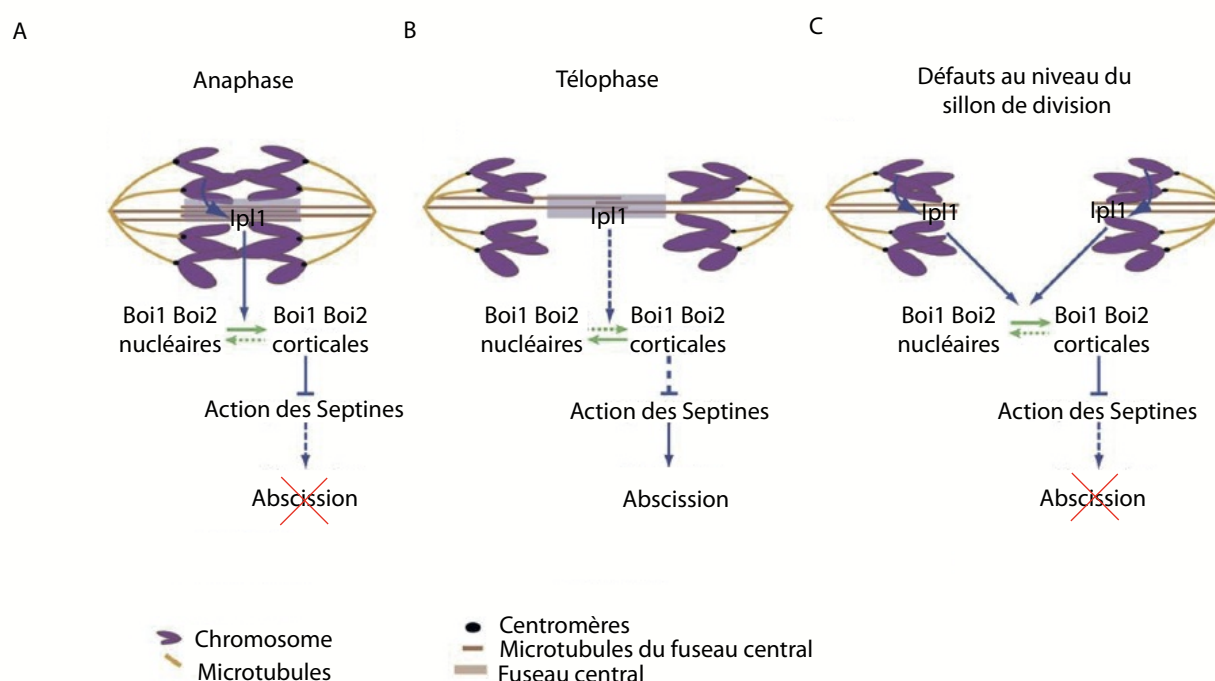


Figure III.2.6: Mécanismes de la voie de signalisation « No Cut » chez la levure. A) En anaphase Ipl1, en contact avec les chromosomes ségrégant, est active ce qui provoque la délocalisation de Boi1 et Boi2 au niveau du cortex où elles inhibent l'activité des septines. L'abscission est inhibée. B) Ipl1 n'est plus en contact avec la chromatine et donc inactivée. Boi1 et Boi2 sont délocalisées du cortex, leur inhibition sur l'activité des septines est levée, l'abscission a lieu. C) En cas de sillon de division défectueux, Ipl1 restée liée à la chromatine est active, Boi1 et Boi2 localisées au niveau du cortex inhibent l'activité des septines et donc l'abscission. (D'après Norden et al., 2006).

Dans les cellules HeLa, en présence de ponts chromatiniens persistants en interphase, Aurora B est toujours active et le corps résiduel présent (Steigemann et al., 2009). On observe la présence de patches d'actine formant des canaux qui stabilisent le

corps résiduel (Steigemann et al., 2009), structure proche des ponts intercellulaires retrouvés au niveau des cellules de la lignée germinale de *Drosophile* (voir Figure III.2.7). Cette structure est également retrouvée dans les amas intercellulaires que forment les spermatocytes humains, au niveau du tissu testiculaire, et où des Anillines et Septines, entre autres, sont présentes (Robinson and Cooley, 1996). Si Aurora B est inactivée au niveau de ces canaux intercellulaires, les cellules entreprennent une régression du sillon de division et se retrouvent binucléés. Aurora B permettrait alors de prévenir la formation de cellules tétraploïdes, plutôt que d'empêcher la formation de cassures au niveau de la chromatine comme c'est le cas chez la levure.

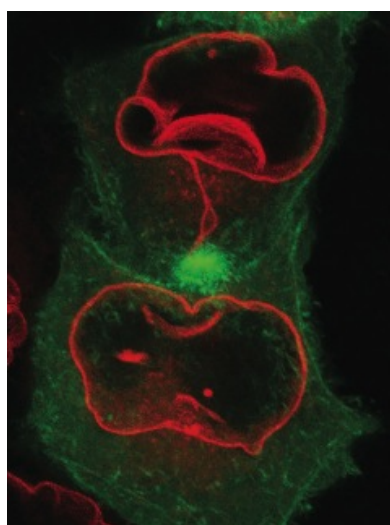


Figure III.2.7 : Formation de patch d'actine en présence de pont chromatinien dans le canal intercellulaire. Photographie de cellule HeLa, en vert est représentée l'actine et en rouge Lap2 β , permettant de visualiser les membranes nucléaires. (D'après Steigemann and Gerlich, 2009).

La résolution par laser des ponts chromatinien provoque l'abscission. De même que l'inactivation d'Aurora B dans les cytokinèses normales entraîne la dissociation des microtubules du corps résiduel, étape nécessaire à l'abscission. En présence de fibres d'amiante au niveau du corps résiduel, la cytokinèse se déroule correctement. L'inhibition de l'abscission par les ponts chromatinien n'est donc pas due à un phénomène mécanique (Steigemann et al., 2009). Une hypothèse est qu'à l'instar de chez *S.Cerevisiae*, la chromatine permettrait d'activer Aurora B, c'est le cas *in vitro* (Kelly et al., 2007) (voir Figure III.2.8). Aurora B phosphoryle MKlp1 au niveau du corps résiduel. Celle-ci ayant un rôle supposé dans la stabilisation du canal intercellulaire, cela pourrait empêcher la régression du sillon de division (Steigemann et al., 2009).

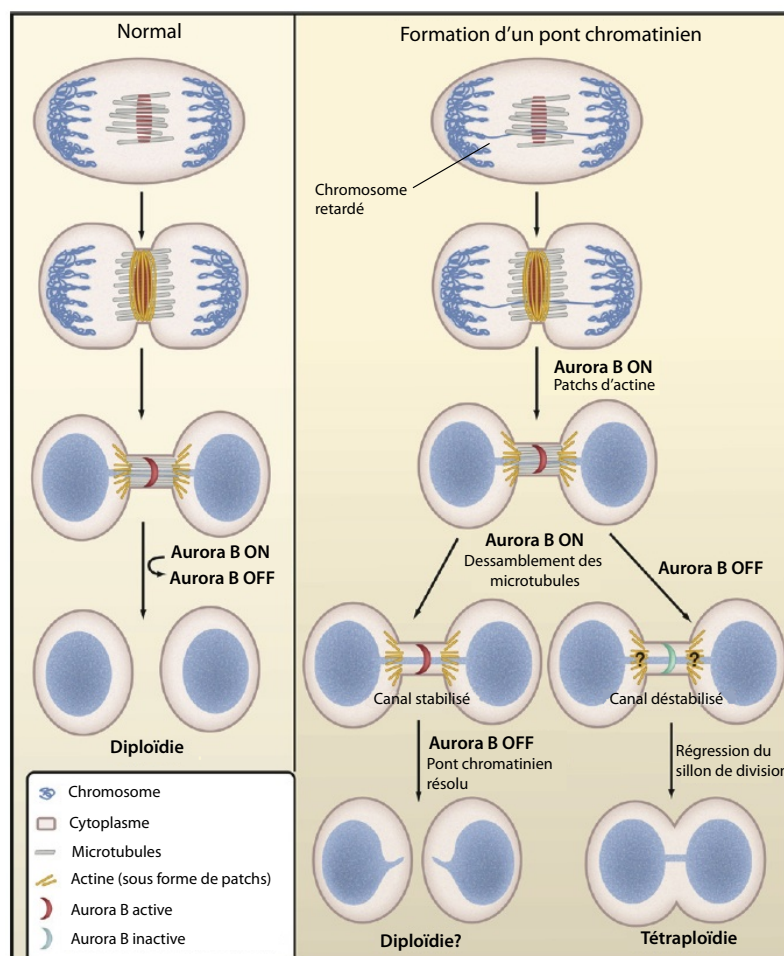


Figure III.2.8 : Rôle présumé de Aurora B dans le point de contrôle de l'abscission. En absence de ponts chromatiniens, situation normale, Aurora B est inactivée au niveau du corps résiduel et l'abscission a lieu. En présence de ponts chromatiniens, résultants de chromosomes traînants, Aurora B permet la formation d'un canal stabilisant la liaison entre les deux cellules filles jusqu'à la résolution du pont chromatinien. En présence d'une Aurora B inactive le pont chromatinien va provoquer la régression du sillon de division, aboutissant à une cellule tétraploïde. (D'après Chen and Doxsey, 2009).

De plus, une étude récente a mis en lumière le rôle d'Aurora B dans la régulation du délai de l'abscission, médiée par le complexe ESCRT-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport III) (Carlton et al., 2012). Ce complexe, localisé au niveau du corps résiduel, se polymérise sous forme de filaments qui entourent le site d'abscission (voir Figure III.2.9). On suppose qu'ils sont impliqués dans la séparation mécanique des deux cellules filles. En outre, « l'anneau » résultant de cette formation filamentaire pourrait permettre de protéger l'ADN des ponts chromatiniens persistants (Petronczki and Uhlmann, 2012). Des expériences de double-hybrides ont mis en évidence l'interaction entre Boréaline et CHMP4C (Charged Multivesicular body Protein 4C), sous-unité du complexe ESCRT-III. Cela permet la phosphorylation de CHMP4C par Aurora B,

ce qui entraîne l'inhibition du rôle effecteur du complexe, et par conséquent l'inhibition de l'abscission. La co-localisation du CPC avec CHMP4 est observée au début de la formation du corps résiduel et se perd en fin de cytokinèse. De même, la phosphorylation de CHMP4C disparaît au fur et à mesure de la cytokinèse (Carlton et al., 2012). Ainsi Aurora B semble réguler la chronologie de l'abscission en inhibant la fonction du complexe ESCRT-III jusqu'à ce que celle-ci soit permise, c'est à dire après résolution des ponts chromatinien au niveau du corps résiduel.

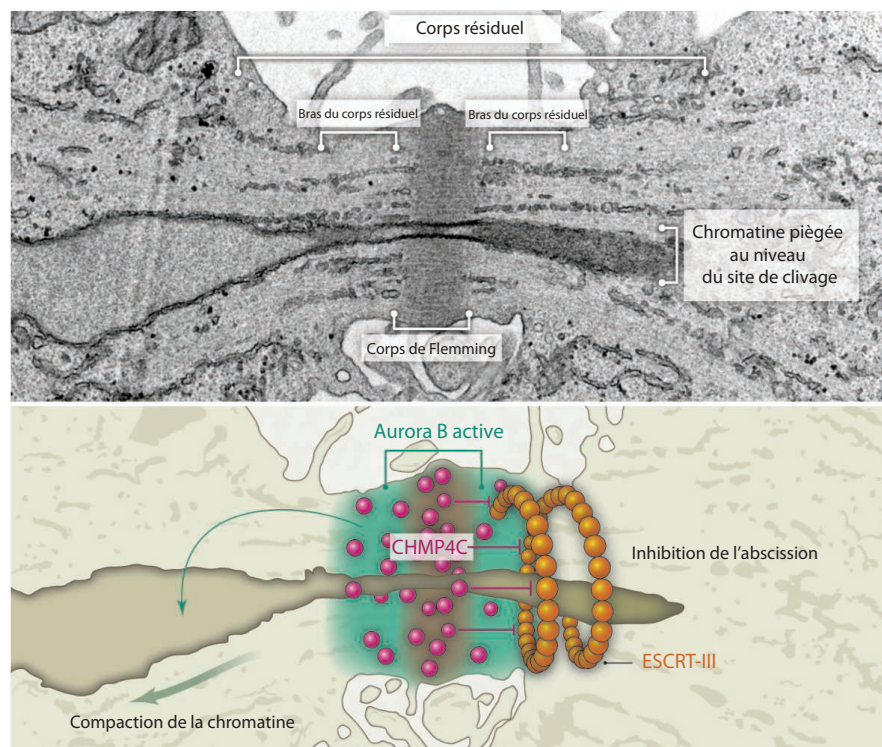


Figure III.2.9 : Aurora B agit sur la sous-unité CHMP4C du complexe ESCRT-III pour inhiber l'abscission en présence de pont chromatinien. Le premier panel montre un cliché de microscopie électronique représentant un pont chromatinien capturé dans le corps résiduel. Le second est une vue schématique du premier. Aurora B, activée par la chromatine, phosphoryle CHMP4C ce qui la localise au niveau du corps de Flemming. CHMP4C inhibe alors l'abscission. (D'après Petronczki and Uhlmann, 2012).

La Nucléoporine Nup 153 pourrait intervenir en amont d'Aurora B dans le point de contrôle de l'abscission. Au cours de la telophase, les nucléoporines sont recrutées à la surface de la chromatine condensée pour reformer la membrane nucléaire. Nup 153 est impliquée dans la formation des paniers nucléaires que l'on retrouve au niveau du noyau. En fin de cytokinèse, elle est requise pour une reconstruction rapide de la membrane. En absence de Nup 153, Aurora B reste active au niveau du corps résiduel et forme quelques foci délocalisés dans le cytoplasme (Mackay et al., 2010).

Bilan

Le complexe des protéines passagères semble impliqué dans la régulation de nombreux processus mitotiques de la prophase à l'abscission (voir Schéma Bilan). La dérégulation de l'expression ou de l'activité d'Aurora B provoque la défaillance des points de contrôle du fuseau mitotique et de l'abscission. L'un comme l'autre sont garants de la diploïdie des cellules ; lorsque celle-ci n'est plus respectée on aboutit à la mort cellulaire, ou à des phénomènes de cancérisation. Cela a entraîné l'utilisation d'inhibiteurs des Aurora comme traitement associé dans de nombreux types de cancers. Cependant, il persiste un certain nombre d'incertitudes sur les rôles exacts du CPC et d'Aurora B, en particulier en seconde partie de mitose.

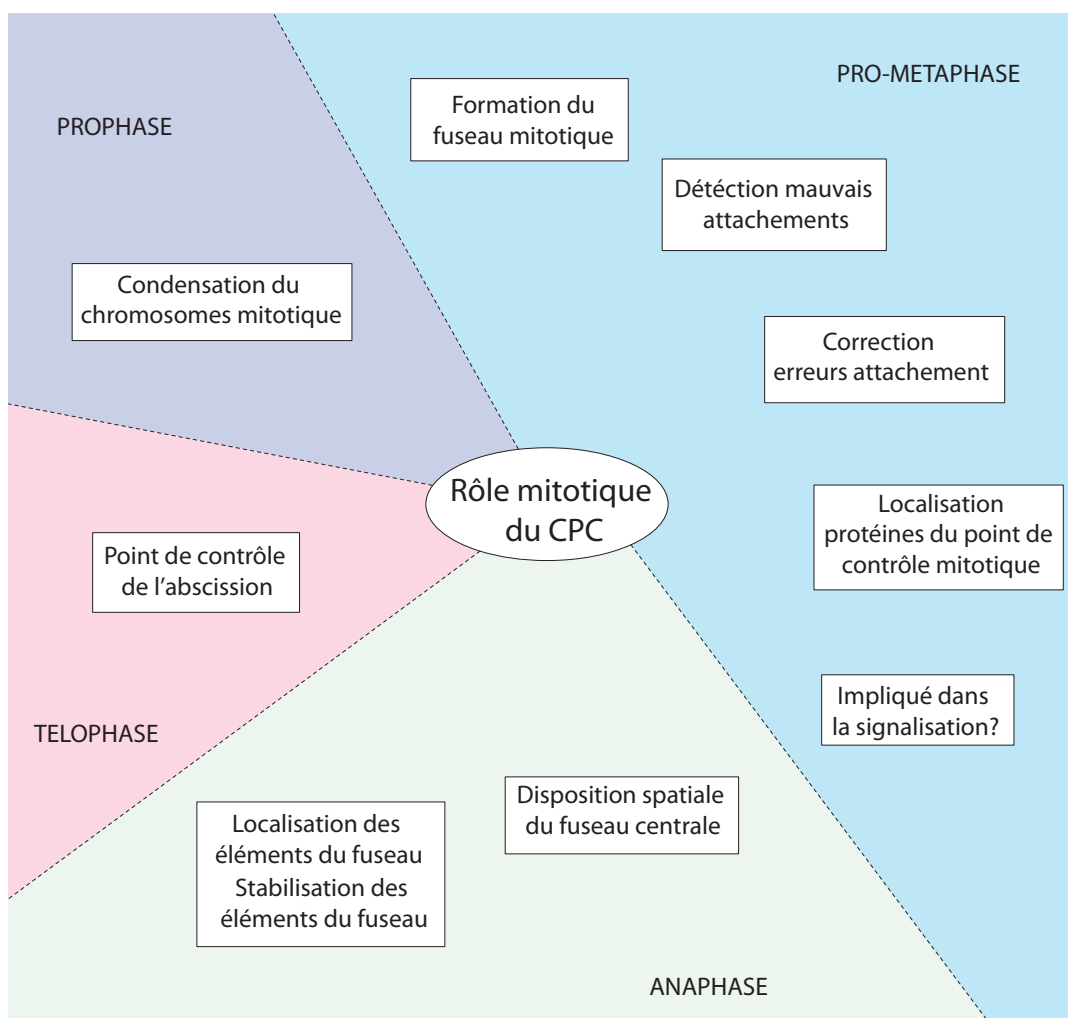


Schéma bilan des fonctions mitotiques du CPC.

Objectifs de thèse

Les méthodes actuelles d'étude d'Aurora B dans les cellules mammifères sont relativement limitées. D'une part, l'utilisation de l'interférence ARN se heurte à la pluralité des processus dans lesquels la kinase est impliquée ; d'autre part, les inhibiteurs existants sont invasifs et pas entièrement spécifiques. S'ajoute à cela la difficulté de disséquer chacune des fonctions mitotiques de la kinase séparément. En effet, la durée brève de la mitose rend souvent nécessaire l'utilisation de drogues permettant l'arrêt des cellules, la plupart du temps en métaphase. Celles-ci, souvent combinées avec l'utilisation d'inhibiteurs d'Aurora B, s'avèrent très invasives pour la cellule.

Pour pallier à cela, l'objectif de ce travail a été le développement d'un système d'optogénétique permettant d'inactiver Aurora B spatio-temporellement. L'optogénétique est une méthode qui associe à la fois les technologies optiques et génétiques. Le chromophore photosensibilisant Killer-Red émet localement des espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) après irradiation (Bulina et al., 2006b; Bulina et al., 2006a). En fusionnant génétiquement Aurora B et Killer Red, on obtient une Aurora B exogène dont l'activité sera détruite, à un moment choisi, par l'émission locale de ROS provoquée par l'irradiation de Killer Red. Dans une cellule où Aurora B-Killer Red pourra être photo-inactivée, l'expression de la protéine endogène sera inhibée par ARN interférence. Ainsi l'activité d'Aurora B peut être spécifiquement et spatio-temporellement supprimée dans une cellule en culture observée au microscope.

Une fois mis en place, ce système peut permettre dans un premier temps de confirmer ou infirmer, avec une méthode d'inactivation spécifique d'Aurora B, les rôles supposés de la kinase. Dans un second temps, ce système peut permettre d'éclaircir les implications d'Aurora B en fin de mitose. De plus, ce système peut permettre de discriminer les fonctions mitotiques enzymatiques de la kinase de celle du complexe. L'étude spatio-temporelle de la kinase peut aider à comprendre la communication entre kinetochores en prométaphase et mettre en évidence un nouveau rôle pour Aurora B dans les voies de signalisation du point de contrôle mitotique.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I. Optogénétique

- *Principe*
- *Chromophore-Assisted Light Inactivation*
- *Pseudogénétique*
- *Dispositif expérimental*
- *Photo-blanchiment*
- *Vidéo-microscopie*

II. Biologie Moléculaire

- *Plasmides utilisés*
- *Clonages*

II. Traitements cellulaires

- *Culture cellulaire*
- *Transfections*
- *Lignées stables*
- *Enrichissement en mitose*
- *Enrichissement en ponts chromatinien*

III. Immunofluorescence

- *Fixation*
- *Immunomarquage*
- *Observation des cellules fixées*

I. Optogénétique

- *Principe*

L'optogénétique consiste en la combinaison des technologies de microscopie et de biologie moléculaire. Celles de « Chromophore Assisted Light Inactivation » (CALI) et de pseudogénétique ont été combinées dans ce travail.

- *CALI*

La technologie « Chromophore-Assisted Light Inactivation » (CALI) permet la photo-inactivation d'une protéine donnée par exposition lumineuse. Ici, le chromophore photo-sensibilisant Killer Red est utilisé comme effecteur de cette inactivation. À la suite d'une excitation lumineuse, Killer Red émet des espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) très localement. Celles-ci vont alors provoquer la dégradation moléculaire des éléments proches ; c'est-à-dire de Killer Red elle-même et de la protéine fusionnée au chromophore. En couplant Aurora B à Killer Red, l'objectif est d'inactiver la kinase par irradiation à un moment choisi. Killer Red est une protéine photo-sensibilisante qui a été générée à partir de la chromoprotéine non-fluorescente anm2CP (Bulina et al., 2006a). Quand l'oxygène réagit avec le chromophore dans son état excité cela provoque la formation d'oxygène singulet (1O) et d'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Sa structure présente un tunnel permettant l'accès du solvant au chromophore, ce qui facilite la formation et la sortie des ROS (Carpentier et al., 2009). La protéine Tag-RFP, qui présente une forte résistance aux ROS (Merzlyak et al., 2007), est utilisée comme construction contrôle.

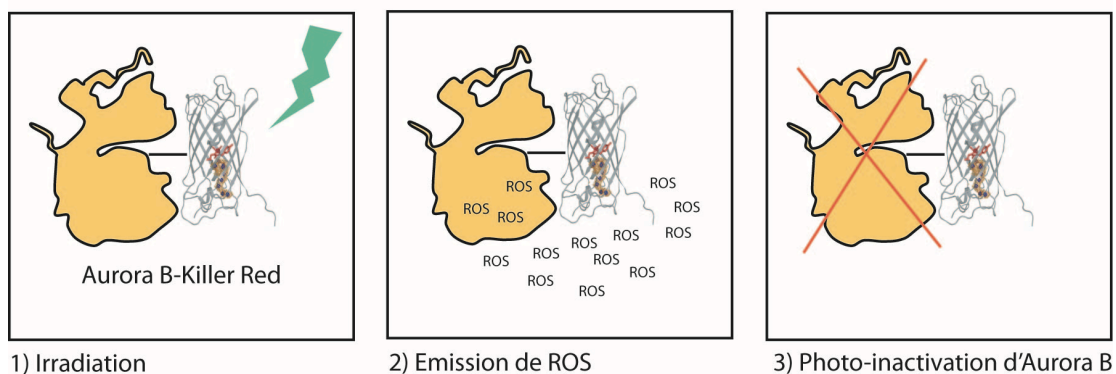


Figure 1 : Principe du CALI par Killer-Red. L'irradiation par une lumière verte de Killer Red (1) provoque l'émission de ROS (2) qui vont inactiver la protéine (3).

- *Pseudogénétique*

La pseudogénétique combine l'extinction par interférence ARN d'une protéine endogène et l'expression ectopique d'une version recombinante de la protéine. Cela est possible grâce à la dégénérescence du code génétique. Il suffit alors de changer les codons ciblés par l'interférence ARN sans pour autant changer la séquence en acides aminés.

- *Dispositif expérimental*

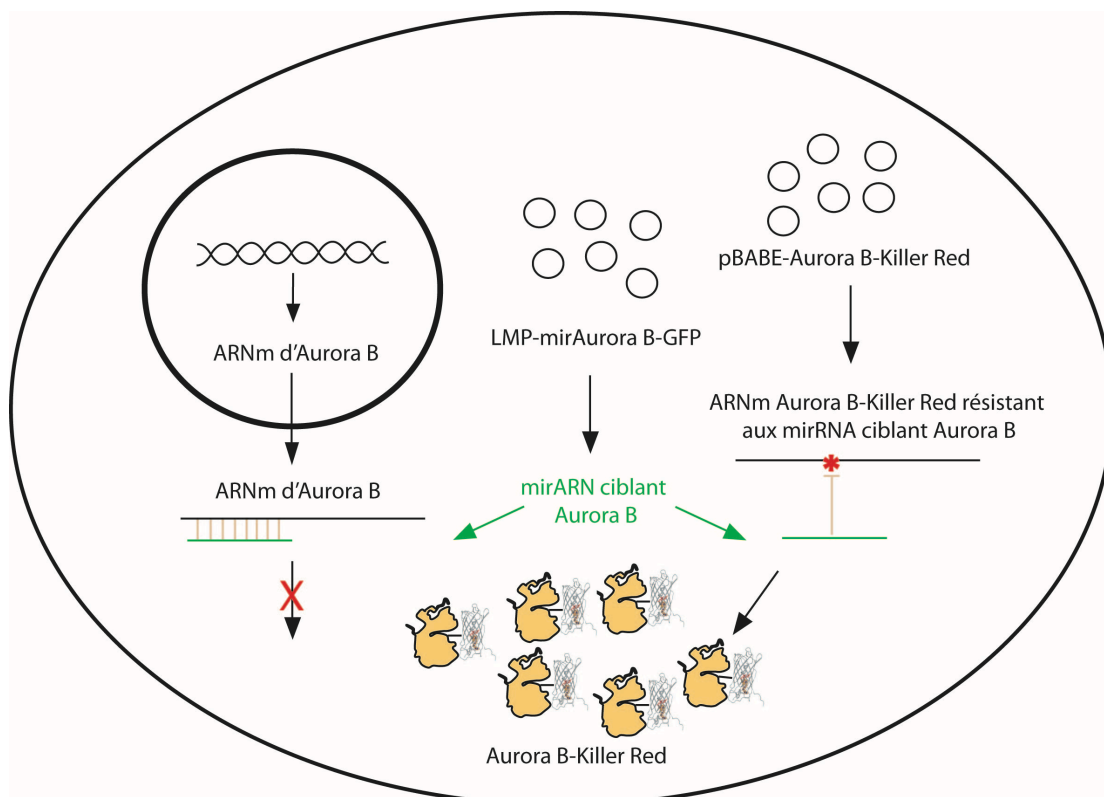


Figure 2 : Cellule type requise pour les expériences d'optogénétique. Après transfection des plasmides LMP-mirAurB-EGFP et pBABE-Aurora B-Killer Red, les micro-ARN ciblent l'ARN messager d'Aurora B endogène et inhibent leur traduction. En revanche, l'ARN messager d'Aurora B-Killer Red, résistant aux micro-ARN, va être traduit, et la protéine exprimée dans la cellule. Celle-ci va remplir les fonctions mitotiques d'Aurora B. Après irradiation d'une telle cellule, l'activité d'Aurora B est abolie.

Pour obtenir l'abolition de l'activité kinase d'Aurora B, il est nécessaire, dans une même cellule, d'avoir l'expression ectopique d'Aurora B-Killer Red

concomitante avec l'abolition par interférence ARN d'Aurora B endogène. La protéine Aurora B-Killer Red peut alors remplir les fonctions mitotiques d'Aurora B, jusqu'à irradiation de la cellule. Aurora B-killer Red alors inactivée, il est possible d'observer l'effet de l'absence d'Aurora B sur la poursuite de la mitose. L'extinction par interférence ARN est réalisée par transfection du plasmide LMP-EGFP-mirAurB qui code pour des micro-ARN dirigés contre Aurora B et pour la protéine EGFP. La présence de la protéine EGFP permet de visualiser que la cellule est transfectée, et facilite le suivi de celle-ci par time-lapse. La transfection du plasmide pBABE-Aurora B-Killer Red, codant pour une séquence d'Aurora B résistante à l'interférence ARN et fusionnée à Killer Red, permet l'expression ectopique de la protéine. (Voir Figure 2).

Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope inversé, équipé d'un incubateur CO₂ à 37°C.

- *Photo-blanchiment*

L'émission de ROS s'accompagne du photo-blanchiment du chromophore. Lorsque celui-ci est presque total, on considère qu'il n'y a plus émission de ROS. Ainsi le photo-blanchiment de Killer Red est utilisé comme critère d'évaluation de l'émission de ROS. L'objectif est d'avoir un photo-blanchiment rapide pour obtenir une quantité de ROS, à un temps donné, la plus significative.

Pour cela 100% de la puissance de la lampe mercure 100W HBO est nécessaire. La bande passante utilisée doit comprendre le pic d'excitation de Killer Red, qui se situe à 585nm (Bulina et al., 2006a). Le pic d'excitation du chromophore contrôle TagRFP est de 555nm (Merzlyak et al., 2007). Le filtre à épifluorescence 25HE de Zeiss, dont le maximum à l'excitation est de 575nm, couvre les spectres d'excitation des deux chromophores (voir Figure 3). Une exposition de 40 à 60 secondes permet d'aboutir à un minimum de 70% de photo-blanchiment. Ces paramètres changent en fonction de l'âge de la lampe, celle-ci doit être changée à partir de 200 à 300 heures d'utilisation.

En microscopie confocale, le laser 561nm a été utilisé pour photo-blanchir Killer Red et TagRFP entre 2 et 5% de puissance avec entre 200 et 1000 itérations sur une à 10 coupes en Z.

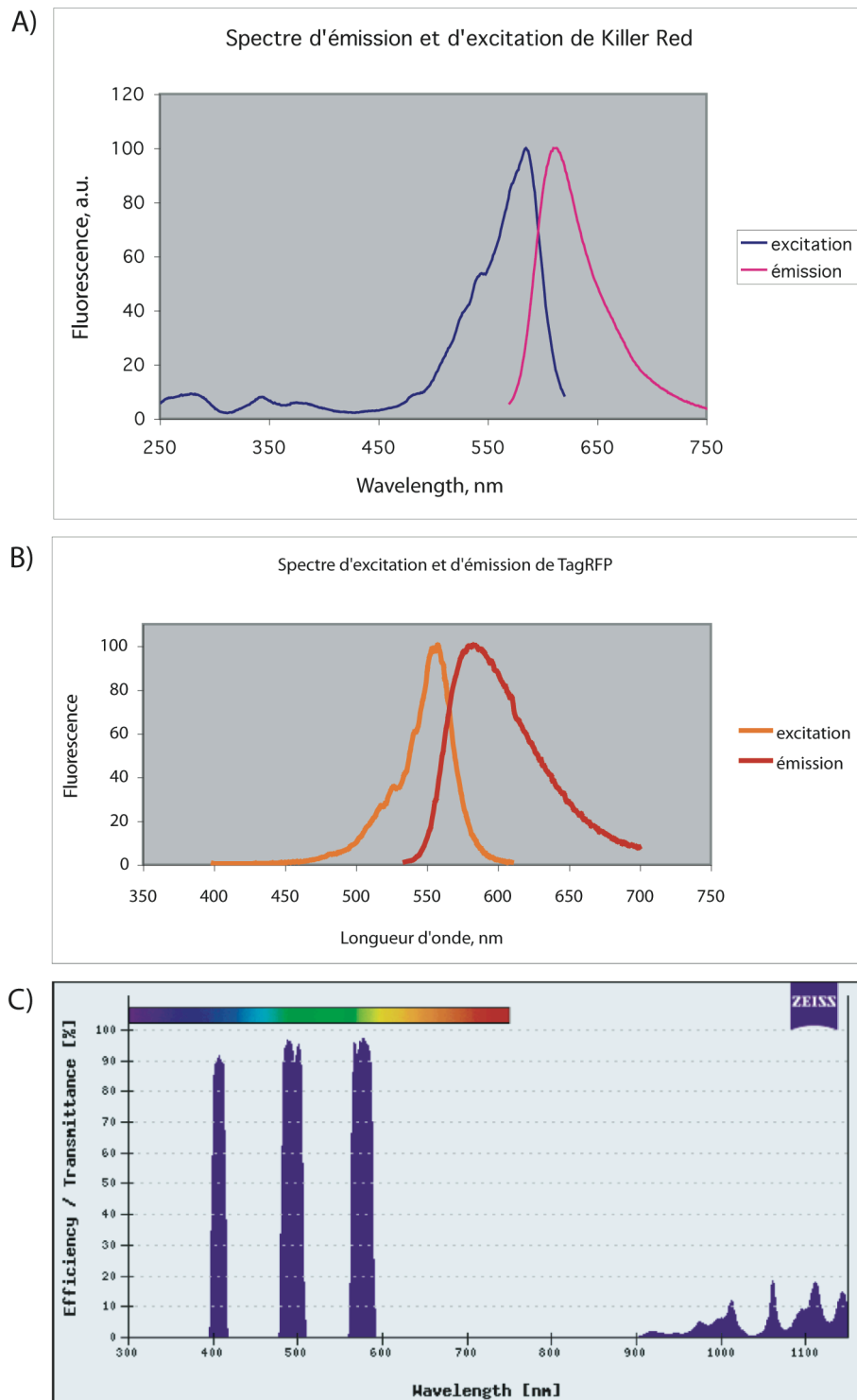


Figure 3 : Le filtre triple 25HE permet l'excitation de Killer Red et Tag-RFP.

A) Spectre d'émission et d'excitation de Killer-Red. Le pic d'excitation se situe à 585 nm et celui d'émission à 610 nm. B) Spectre d'émission et d'excitation de Tag-RFP. Le pic d'excitation se situe à 555 nm et celui d'émission à 584 nm. (Spectres provenant du site internet d'Evrogen). C) Le spectre représente l'efficacité de transmission de la lumière à travers le filtre triple 25 HE suivant les longueurs d'ondes. Le troisième pic, dont le maximum est à 575 nm, couvre le pic d'excitation de Killer Red. (Spectre provenant du site internet de Zeiss).

- *Vidéo-microscopie*

La position de chaque cellule, une fois irradiée, est enregistrée. Un time-lapse réalisé sur plusieurs heures, avec une photo prise toutes les 15 ou 20 min, permet de suivre leur destinée cellulaire. Pour visualiser les cellules, les images sont prises en DIC (contraste interférentiel différentiel) et en FITC, à travers un objectif 63 X. Jusqu'à 40 cellules peuvent ainsi être suivies par expérience. Des lab-teks NUNC, avec un fond lamelle en verre, compartimentées en 2 puits, sont utilisées, permettant d'avoir des cellules pour réaliser le CALI d'Aurora B et des cellules contrôles dans la même expérience.

II. Biologie moléculaire.

- *Plasmides utilisés*

Différents plasmides ont été utilisés issus de constructions à partir des plasmides commerciaux pBABE-puro (Addgene), pLMP (Open Biosystems), pEGFP N et C (Clontech). Ils sont listés dans le tableau ci-dessous.

Plasmides	Expression	Origine
pBABE-Aurora B-KR	Aurora B-KR	pBABE-puro
pBABE-Aurora B-RFP	Aurora B-RFP	pBABE-puro
pBABE-Aurora K106A-KR	Aurora B K106A-KR	pBABE-puro
LMP-mirAurB-GFP	mirAurB/GFP	LMP
LMP-mirAurB	mirAurB	LMP
pSurvivine-GFP	Survivine-GFP	pEGFP-C
pBoréaline-GFP	Boréaline-GFP	pEGFP-C
pGFP-Incenp	GFP-Incenp	pEGFP-N

Tableau 1 : Liste des plasmides utilisés.

Les plasmides GFP-Incenp, Survivine-GFP, et Boréaline-GFP ont été utilisés dans de précédentes publications de l'équipe (Delacour-Larose, 2007).

- *Clonages*

Les séquences de Killer Red et Tag-RFP proviennent des plasmides pKiller Red et pTagRFP (Evrogen™), à partir desquels elles ont été amplifiées par PCR classique, puis clonées dans le plasmide pBABE-puro par les enzymes EcoRI et Sall (NEB). La séquence d'Aurora B, flanquée en N-terminal d'un tag HA, a été amplifiée par PCR à partir du pcDNA-HA Aurora B (Scrittore et al., 2005), puis clonée avec les enzymes BamHI et XhoI (NEB) dans le plasmide pBABE-puro. Les PCR ont été réalisées à l'aide de l'ADN polymérase High Fidelity (Roche) (voir amorces Tableau 2). Les produits PCR sont placés dans le vecteur commercial pGEM®-T-easy (Promega) avant sous-clonage dans le plasmide pBABE-puro.

La séquence d'Aurora B K106A a été générée par mutagenèse dirigée (kit QuikChange, Stratagene) sur le plasmide pBABE-Aurora B-KR (voir Tableau 2).

Amorces	Séquences (sens/antisens)
Killer-Red	5'gaattccatatgctcgagATGGGTTTCAGAGGGCGG3' / 5'gtcgacTTAATCCTCGTCGCTACC3'
Tag-RFP	5'gaattcgatatccatatgctcgagATGGTGTCTAAGGGCGAAGAGC3' / 5'gtcgacTCAATTAAGTTTGTGCCCCAGTTTG3'
Aurora B	5'ggatccATGGACTACCCTTATGATGTGCC3' / 5'ctcgagGGCGACAGATTGAAGGGCAG3'
Aurora B K106A	5'ctcgctgtcctctcaagtc3' / 5'gacttgaaggagacagcgag3'

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour les différents clonages.

La séquence, ci-dessous, du micro-ARN dirigé contre Aurora B a été conceptualisée à partir du pSUPER-Aurora B (Scrittore et al., 2005).

5'ctcgagaaggtatatTGCTGTTGACAGTGAGCGCAGAGCCTGTCACCCCATCTGCTAGTG
AAGCCACAGATGTAGCAGATGGGGTGACAGGCTCTTTGCCTACTGCCTCGGAattc3'

Elle a été générée par Geneart (Invitrogen), et sous-clonée dans le plasmide LMP-GFP (Expression arrest™ LMP micro-RNA-adapted retroviral shRNA vector, Open Biosystems Thermoscientific) par les enzymes XhoI et EcoRI.

Les constructions obtenues ont été vérifiées par séquençage. Les différentes préparations de plasmides ont été purifiées à l'aide du kit HiSpeed®Plasmid Purification (QIAGEN), pour transfection.

III. Traitements cellulaires.

- *Culture cellulaire*

Les cellules HeLa sont cultivées dans un milieu DMEM classique (GIBCO™), contenant 10% de sérum de vœu fœtal (SVF) (Thermofisher scientific), et incubées à 37°C dans une atmosphère saturée en H₂O et à 5% de CO₂. 3µg/ml de blasticidine S hydrochloride (Sigma Alrich) sont ajoutés au milieu pour la culture des lignées stables HeLa H₂B-GFP {Behlke-Steinert, 2009 #1}. Et 3µg/ml de puromycine pour les lignées HeLa Aurora B-KR et Aurora B-RFP. Au cours des expériences de vidéomicroscopie, les cellules sont incubées dans du milieu de culture F-12 (GIBCO™) supplémenté avec 10% de SVF, 5% de PenStrep (GIBCO™), et 5% de Glutamine (GIBCO™).

- *Transfections transitoires*

À environ 80% de confluence, les cellules sont transfectées avec de la Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen), en respectant les instructions du fournisseur. La transfection a lieu 48hrs avant la vidéomicroscopie ou la fixation des cellules. Les cellules sontensemencées sur des lamelles stériles polylysées (0,2 mg/ml) 24-48hrs avant transfection pour les expériences d'immunofluorescence, et sur des LabtekII (Nunc) 24 hrs après transfection pour la vidéomicroscopie.

- *Lignées stables*

Des lignées stables HeLa Aurora B-KR et Aurora B-RFP ont été générées à partir des plasmides pBABE-Aurora B-KR et pBABE-Aurora B-RFP, à l'aide du rétrovirus MoMuLV (Moloney Murine Leukemia Virus). Les cellules d'emballage Phoenix (Euromedex) ont été transfectées à l'aide du kit de transfection Lipofectamine™ 2000. Les rétrovirus contenant les séquences d'intérêts sont récupérés dans le surnageant du milieu de culture, entre 2j et 4j après transfection. Les cellules cibles subissent 3 séries d'infections avec un mélange composé de 5ml de milieu frais, 5ml de surnageant préalablement centrifugé et filtré, et 8 µg/ml de polybrène (Sigma-Aldrich). 32h après la dernière infection, la sélection des clones est réalisée par puromycine (3µg/ml).

- *Enrichissement en mitose*

Pour enrichir le tapis cellulaire en mitose, les cellules sont synchronisées à l'aide d'un protocole de double blocage à la thymidine. L'excès de thymidine sature la ribonucléotide réductase, ce qui interrompt la synthèse d'ADN au cours de la réplication et provoque l'arrêt des cellules en phase G1/S du cycle cellulaire. La thymidine (Sigma Aldrich), diluée dans du SVF ou du milieu de culture et filtrée, est utilisée à une concentration finale de 2mM dans le milieu. Le milieu reste en présence de thymidine pendant 17hrs, après quoi 3 lavages, à l'aide du milieu de culture, permettent de retirer l'excès de thymidine. Un repos de 8hrs permet aux cellules de poursuivre le cycle, puis un nouveau blocage de 16hrs en présence de thymidine a lieu. 7 à 12hrs après le dernier lavage, la totalité des cellules entrent en mitose. (Voir Figure 4).

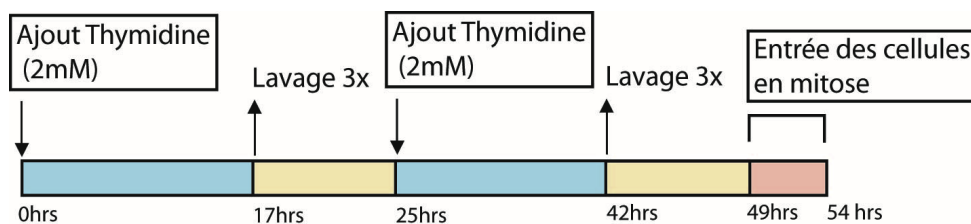


Figure 4 : Synchronisation des cellules en mitose à l'aide du double blocage à la Thymidine.

- *Enrichissement en ponts chromatiniens*

Pour enrichir le tapis cellulaire en ponts chromatiniens, il est nécessaire d'obtenir des chromosomes retardés en anaphase. Le nocodazole est une drogue dépolymérisante des microtubules, à faible dose, celle-ci déstabilise légèrement le fuseau mitotique de prométaphase. Cela entraîne l'augmentation des kinétochores mérotéliques, responsables des chromosomes retardés en anaphase. Pour cela les cellules ont été incubées pendant 3hrs dans un milieu contenant 2μM de nocodazole puis lavées 3 fois avec du milieu de culture. (Cimini *et al.*, 2003).

IV. Immunofluorescence

- *Fixation*

48h après transfection, les cellules sont fixées dans 2% de Paraformaldéhyde (Sigma Aldrich)-PBS 1X (GIBCO™) pendant 20 min à 37°C. Après 3 lavages au PBS 1X, elles sont perméabilisées dans 0.2% Triton-PBS 1X pendant 3 min.

- *Immunofluorescence*

Les cellules sont incubées pendant une heure à 37°C successivement dans les solutions d'anticorps primaires et secondaires (dilués dans 3% BSA-PBS 1X-0.05% Tween) avec 3 lavages de 5 min au PBS 1X entre chaque incubation. L'anticorps primaire anti-Aurora B N-term (Epitomics) est dilué au 1/500^{ème}. L'anticorps secondaire anti-lapin (Jackson), couplé au FITC, est dilué au 1/300^{ème}. L'ADN est marqué par 0.1µg/ml Hoechst-PBS 1X et après 3 lavages de 5 min au PBS 1X, les lamelles sont montées sur lames à l'aide d'une goutte de DABCO.

- *Observation des cellules fixées*

Les clichés sont obtenus à l'aide du microscope à épifluorescence droit AxioImager Z1 (Zeiss) équipé du logiciel Axio vision. Les objectifs utilisés sont 63X plan-Apo (NA 1.4) et 100X plan-Neofluar (NA 1.3). Les trois jeux de filtres 49 (DAPI, Hoechst), 38 HE (GFP), et 43 HE (Cy3) (Carl Zeiss Microimaging) et la lampe mercure 100 W HBO sont utilisés pour l'excitation fluorescente. Les cellules sont filmées par une caméra CCD Orca R2 B/W (Hamamatsu).

Résultats

- **Article :** New insights in Aurora B's function using chromophore assisted light inactivation (CALI).
- **Résultats annexes.**
 - I. CALI à l'aide du laser 561 nm.
 - II. CALI sur des cellules enrichies en ponts chromatinien.

New insights in Aurora B's mitotic functions using chromophore assisted light inactivation (CALI)

Axelle Davidas¹, Fabienne Hans¹, Stefan Dimitrov¹, Dimitrios A. Skoufias²

¹Institut Albert Bonniot Inserm U823

²Institut de Biologie Structurale (CNRS-CEA-UJF) UMR5075

Introduction

Aurora B kinase, along with Survivin, Borealin and Incenp, belongs to the chromosomal passenger complex (CPC) (Ruchaud et al., 2007) which is involved in many key processes throughout mitosis. The function of the CPC complex is tightly linked with the dynamic nature of its localization. In early mitosis the CPC is localised along the chromosome arms where it is thought to contribute through the Aurora B kinase activity to the histone H3 phosphorylation on S10 and S28, leading to chromosome condensation, supposedly by preventing the interaction between Heterochromatin Protein 1 (HP1) and the heterochromatin (Crosio et al., 2002; Terada, 2006). The presence of the CPC along the chromosome arms may also contribute to the microtubule nucleation around chromosomes leading to spindle assembly (Tseng et al., 2010; Kelly et al., 2007). In prometaphase, the complex concentrates at the inner centromeres where it is involved in the proper chromosome congression (Ruchaud et al., 2007). On the other hand, Aurora B is implicated in triggering the mitotic checkpoint by being involved in the microtubule-kinetochore error correction pathway. Faithful segregation of sister chromatids requires that the kinetochores have to be correctly attached to microtubules emanating from the facing spindle poles (amphitelic attachment). However, often a single kinetochore is captured either by microtubules emanating from the opposite cell pole (syntelic attachment), or from microtubules emanating from both poles (merotelic attachment), or one of the sister kinetochores is not captured at all by microtubules (monotelic attachment). Those erroneous attachments need to be corrected in order to pursue mitosis: this correction process involves Aurora B mediated phosphorylation of key microtubule associated proteins, leading to microtubule destabilization with a subsequent activation of the spindle assembly checkpoint until the proper microtubule kinetochore interactions are established (Musacchio and Salmon, 2007). After the resolution of the mitotic checkpoint, chromosomes start to segregate toward the opposite cell poles, the CPC transfers to the central spindle and concentrates at the ends of the overlapping microtubules in the spindle mid-zone (Ruchaud et al., 2007). During anaphase the substrates of Aurora B belong both to the central spindle and the actin-myosin contractile ring (Glotzer, 2005; Ozlu et al., 2010). After complete constriction of the furrow, the passenger protein complex is found in the midbody (Ruchaud et al., 2007).

Aurora B in the midbody is shown to be implicated in the final abscission checkpoint, where it inhibits cytokinesis when there are chromosome bridges connecting the two cytoplasm of the uncleaved cells (Steigemann et al., 2009).

Current tools limit the study of Aurora B's mitotic functions in a temporal manner. Inhibitors are not fully specific for the kinase, and the use of RNA interference (RNAi) allows only a global appreciation of the kinase role when the cell enters mitosis. Moreover, in order to investigate Aurora B functions in the late steps of mitosis, for the purpose of cell synchronization one has to use either reversible mitotic inhibitors or inhibitors that bypass the mitotic checkpoint arrest that may be very invasive and mask the activity of Aurora B (Skoufias et al., 2007; Kwiatkowski et al., 2012; Hu et al., 2008).

To assess the different roles of Aurora B in every single phase of mitosis separately, we have developed an optogenetic approach based on chromophore assisted light inactivation (Bulina et al., 2006b). We have combined miRNA ablation of endogenous Aurora B with ectopic expression of miRNA silent-resistant Aurora B fused to the photosensitizer Killer Red protein (AurB-KR) in cells (Scrittore et al., 2005; Hans et al., 2009). Irradiation at distinct phases of mitosis led to photobleaching of Killer Red protein, accompanied by photoinactivation of the fused Aurora B through emission of reactive oxygen species (ROS) (Bulina et al., 2006a). Time lapse microscopy experiments showed that photoinactivation of Aurora B-Killer Red at different phases of mitosis resulted in distinct phenotypes. Photoinactivation at pro-meta and metaphase led to cytokinetic failure due to cleavage furrow regression associated with entry into anaphase with chromosome bridges. CALI at early anaphase also led to cytokinesis failure underlying the role of Aurora B in central spindle function in cytokinesis. We also found that ROS inactivation of Aurora B did not alter the distribution pattern of the passenger protein complex members. Importantly, photoinactivation of Aurora B-Killer Red at the midbody, following cleavage furrow constriction, had no effect on the completion of abscission, a phenotype consistent with a role of Aurora B in the recently proposed abscission checkpoint (Steigemann et al., 2009). The data, obtained with CALI of Aurora B, allowed us to differentiate the distinct roles of Aurora B, not only as a kinase, but also as a member of the CPC, in the different stages of mitosis and cytokinesis including abscission.

Results and discussion

Optogenetics for Aurora B

Chromophore assisted light inactivation (CALI), is based on the premise that the photosensitizer Killer Red engineered from the chromophore EGFP to produce locally upon irradiation reactive oxygen species (ROS) that inactivate the protein genetically fused with Killer Red (Bulina, 2006a; Bulina, 2006b). We decided to pursue the CALI approach in order to abolish the activity of the recombinant protein Aurora B-Killer Red (Aurora B-KR) at each single phase of mitosis separately. In order to study the function of the Aurora B-KR in the absence of the activity of the endogenous protein, we followed a pseudogenetic approach (Scrittore et al, 2005) by which we engineered a plasmid, pBABE-Aurora B-KR, producing a transcribed recombinant message resistant to RNAi. We also created plasmids coding for a micro-RNA directed against Aurora B, LMP-mirAurB and LMP-EGFP-mirAurB, which also codes for the green fluorescent protein EGFP. Combinations of the above plasmids were co-transfected in HeLa cells to obtain cells suitable for the optical part of the experiment

We first checked if the Aurora B-KR is fully functional upon transfection into cells and whether it can substitute the endogenous Aurora B following miRNA silencing. Upon Aurora B RNAi shutdown on HeLa cells, chromosomes failed to properly align on the metaphase plate, leading to anaphase chromosomes bridges that persisted all through cytokinesis (Figure 1 A). The percentage of aberrant mitosis in Aurora B-KR rescued cells though, decreased from 60% to 18%, and close to the 7% in control cells (Figure 1 B). This indicates that the recombinant protein Aurora B-KR was fully functional as it fully restored the control phenotype when expressed in cells depleted of Aurora B by RNAi.

Furthermore, before we proceeded with CALI we controlled for the effects of the photobleaching, which is necessary for the Aurora B-KR inactivation. For control purposes Aurora B fused to RFP protein was tested as a control. Aurora B-RFP is a red fluorescent protein whose structure enables a limited release of ROS upon irradiation. To photo-inactivate Aurora B, cells transfected with pBABE-Aurora B-KR and LMP-EGFP-mirAurB were exposed 40 to 60 seconds with 100% power of the HBO mercury lamp. The bleach efficiency mostly depended on the age of the HBO lamp; we found that at least 70% bleach of the fluorescent proteins is required to pursue the experiments. Our experimental conditions led to roughly 85% bleach in average for both Aurora B-KR

and Aurora B-RFP recombinant proteins (Figure 1 C). Therefore we could proceed with CALI of Aurora B-KR using Aurora B-RFP as a control for the effects of photobleaching.

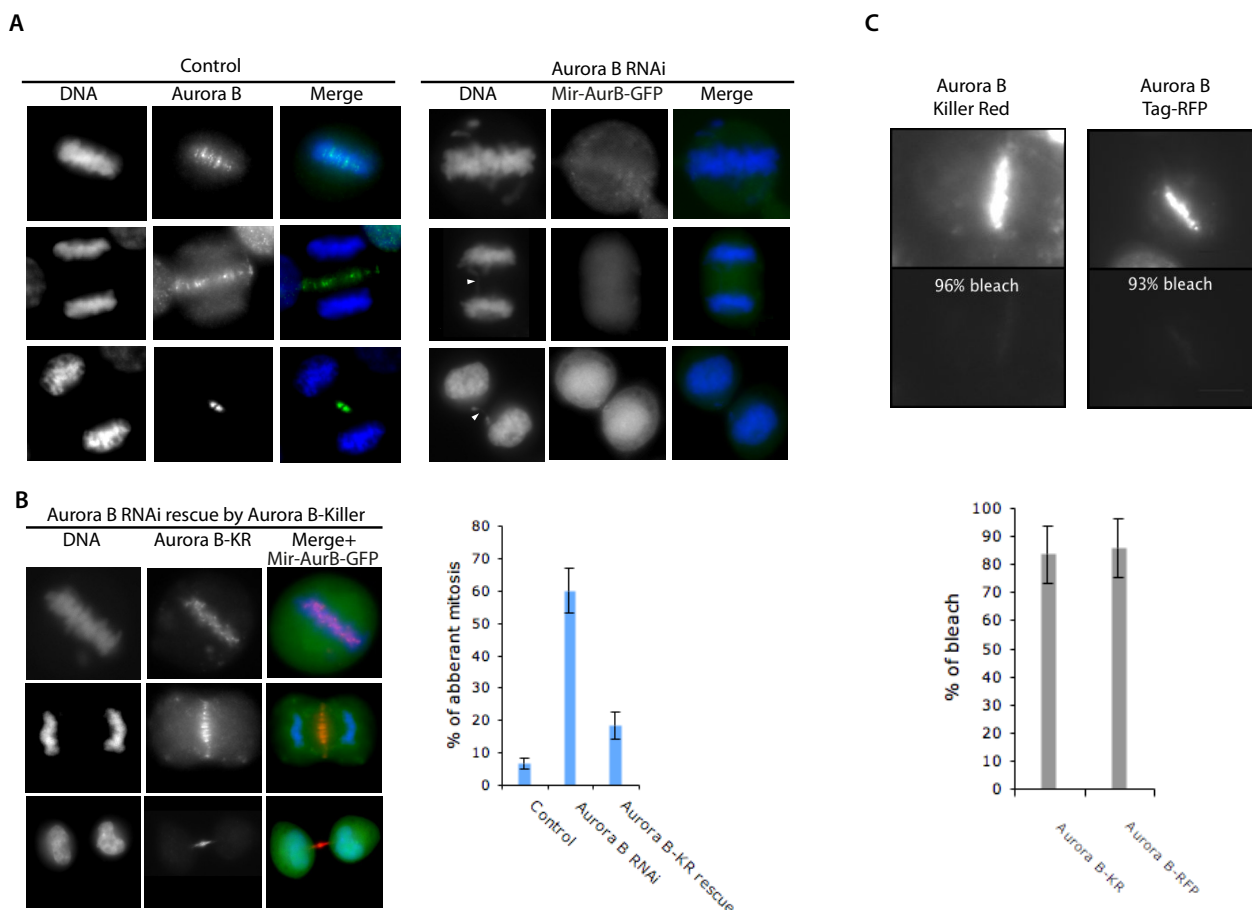


Figure 1. Endogenous Aurora B substitution by Aurora B-KR for the purposes of CALI.

(A) Effect of RNAi depletion of Aurora B in cells. Control HeLa cells (left panles) and cells transfected with the plasmid LMP-GFP-mirAurB encoding for the GFP and a micro-RNA directed against Aurora B (right panels). Aurora B micro-RNA induces lagging chromosomes and/or chromatin bridges (white arrows).

(B) Aurora B-KR substitutes endogenous Aurora B. HeLa cells co-transfected with pBABE-Aurora B-KR and LMP-EGFP-mirAurB undergo normal mitosis. The bar graph depicts the quantification of the mitotic defects observed under the conditions described for panels A and B; (n>40)

(C) Aurora B-TagRFP is bleached under similar illumination conditions used for Aurora B-KR inactivation. Equal bleaching efficiency after 40-60 seconds of illumination with 100% power of the HBO mercury lamp between Aurora B-KR and Aurora B-TagRFP; more than 80% of each protein is bleached; (n=10).

Chromophore assisted light inactivation of Aurora B in early mitosis leads to aberrant mitosis

To demonstrate that CALI could lead to loss of Aurora B activity, we checked if irradiation during the first phases of mitosis (prophase to metaphase) could provoke mitotic defects. We followed chromosome segregation in a HeLa cell line expressing stably H₂B-GFP after bleaching of Aurora B-KR and depleted of endogenous Aurora B by miRNA. Chromosome bridges were observed throughout anaphase that remained trapped in the midbody during cytokinesis (Figure 2A). Chromosome bridges are characteristic of aberrant entry into anaphase and a lack of mitotic checkpoint response in metaphase, consistent with previous results obtained with inhibitors and RNAi targeting Aurora B [Cimini, 2006 #9]. Longer observation of metaphase photoinactivated cells, resulting into chromosome bridges in anaphase, led to furrow regression and cytokinesis failure. (Figure 2B). Furthermore, CALI of Aurora B-KR in early mitosis resulted in 12% of cells that failed to enter anaphase, remaining blocked in early mitotic stages retaining their round shape for hours (740 min post bleaching; Figure 2C). The fate of the round blocked cells was not followed for longer times and we could not determine by DIC if the cells ended up as interphase multinucleate cells, as it has been previously reported for cells treated with Aurora B inhibitors. It has to be noted also that about 40% of the photoinactivated cells did not produce a discernable phenotype. The reasons for the lack of a phenotype may be that the levels of ROS production may have not been adequate for complete inactivation of Aurora B-KR or that the RNAi mediated depletion of endogenous Aurora B was not complete and therefore there was still some active kinase that could fulfil the necessary mitotic functions.

The cumulated observed cellular phenotypes demonstrate that following CALI of Aurora B-KR in cells depleted of endogenous Aurora B, close to 58% of the cells underwent aberrant mitosis (Figure 2C). In contrast, in cells expressing Aurora B fused to Tag-RFP, used as control, bleaching under the same conditions showed no mitotic defects (Figure 2A, 2B, 2D). Control time-lapse experiments from different conditions also showed correct mitosis irrespective of the presence or absence of endogenous Aurora B (Figure S2). CALI of Aurora B-KR is thus specific and allows to temporally abolish the activity of the kinase.

The results demonstrate the nature of the observed phenotypes subsequent to after Aurora B activity shutdown, at the time when the CPC is already concentrated in

the inner centromeres, from prometaphase to metaphase (Figure 2). Two phenotypes were observed, either cells remained blocked in a prometaphase state and did not proceed to completion of chromosome segregation (10% of the cells) or cells (50%) failed in cytokinesis following cleavage furrow regression due to trapped chromosome bridges in the midbody following aberrant entry into anaphase.

In the minority of the affected cells, representing roughly 10% of the photobleached cells, cells remained in an apparent mitotic state, indicating an active spindle checkpoint, which was not bypassed by the abolishment of Aurora B activity. Most likely the number of mis-attached kinetochores is high enough to keep the checkpoint active in absence of the kinase activity. In pro-metaphase, Aurora B is located to the inner centromere (Ruchaud et al., 2007) where it can phosphorylate kinetochore substrates. These substrates, once phosphorylated, provoke the destabilisation of the microtubules/kinetochore attachment, either by disturbing the affinity between both; in the case of the phosphorylation of the kinetochore component HEC1 (Sundin and Deluca, 2010), or by depolymerising microtubules; such as the phosphorylation of the kinesin MCAK, which centromeric localisation and regulation depend on Aurora B (Knowlton et al., 2006). This enables Aurora B to remove misattached kinetochores. The CALI data are consistent with the requirement of an active Aurora B to obtain correctly attached kinetochores.

In the majority of the photo-bleached cells, 50% of the cells entered anaphase with lagging chromosomes, which indicates that the cells had bypassed the spindle assembly checkpoint. Lagging chromosomes mostly result from uncorrected merotelic attachments in metaphase, indicating that the checkpoint failed to detect these erroneous attachments in the absence of Aurora B activity. This is consistent with the use of a low dose of ZM447439 (inhibitor of Aurora B) where 60% of merotelic kinetochores are observed in Ptk1 cells (Cimini et al., 2006; Cimini, 2007). Likewise, Aurora B inhibition with Hesperadin leads to an increasing amount of merotelic kinetochores in S3 cells (Knowlton et al., 2006). Most importantly, the presence of lagging chromosomes trapped in the middle of the cell led to cleavage furrow regression and aborted cytokinesis.

Figure 2:

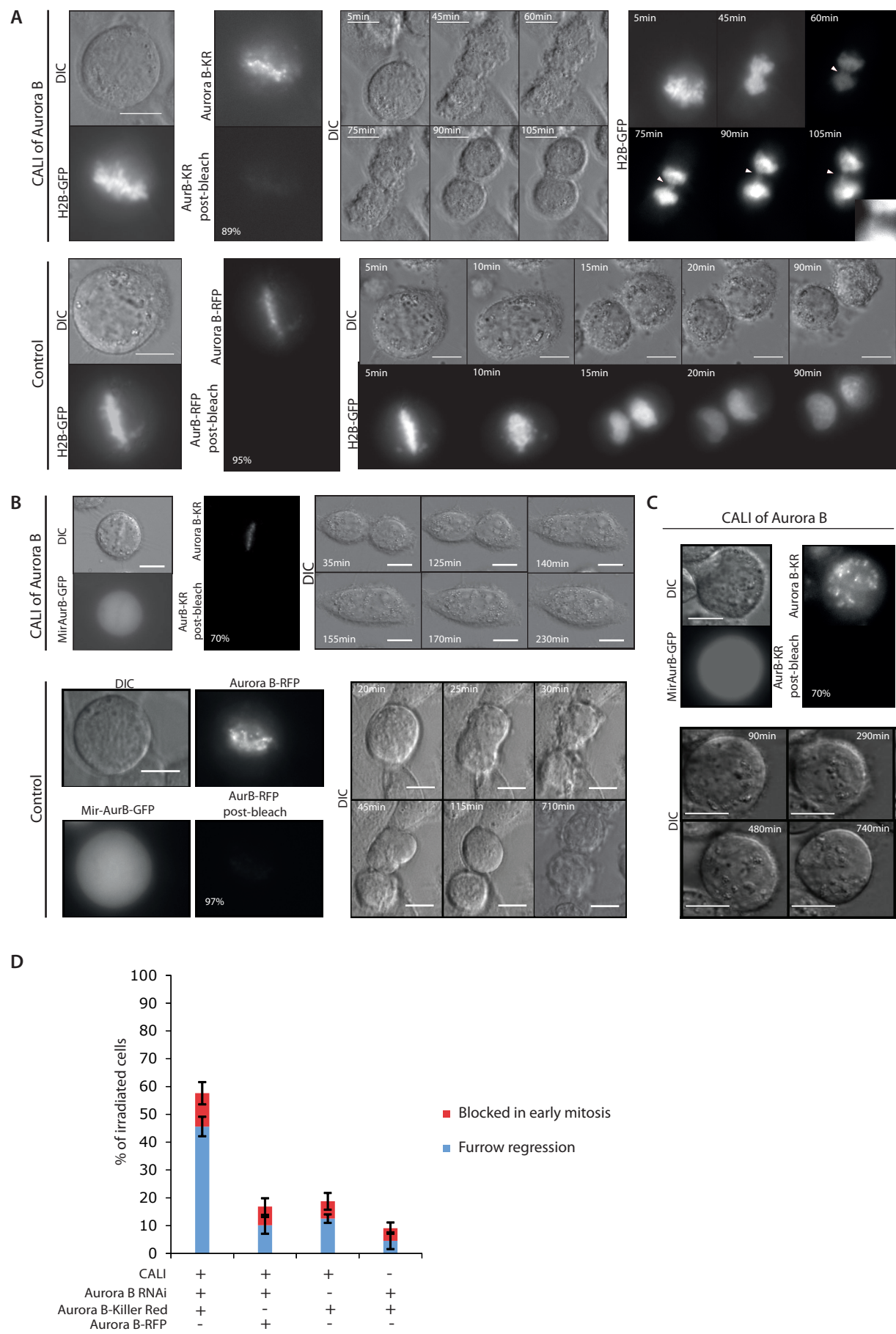


Figure 2. Aberrant mitosis following CALI of Aurora B in early mitosis.

(A) Images of cells after time-lapse observation of H2B-GFP HeLa cells either co-transfected with pBABE-Aurora B-KR (top panels), or pBABE-Aurora B-TagRFP for control (lower panels), and LMP-mirAurB to deplete endogenous Aurora B. White arrows show chromatin bridges. The percentages of bleach of the recombinant proteins are represented on the pictures post-bleach.

(B) HeLa cells expressing either Aurora B-KR (top panels) or Aurora B-Tag-RFP (lower panels) for control, with a LMP-EGFP-mirAurB mediated ablation of the endogenous protein. Selected images from the time-Lapse observation show time after irradiation. Cytokinesis failure is observed upon CALI of Aurora B.

(C) Same as in B showing a cell that failed to enter anaphase and staying blocked in early mitosis for hours after CALI of Aurora KR.

(D) The bar graph depicts the quantification of the mitotic defects observed under the different experimental conditions collected from time lapse experiments similar to those shown in panels A and B and C. (Data were collected from 10 to 100 cells).

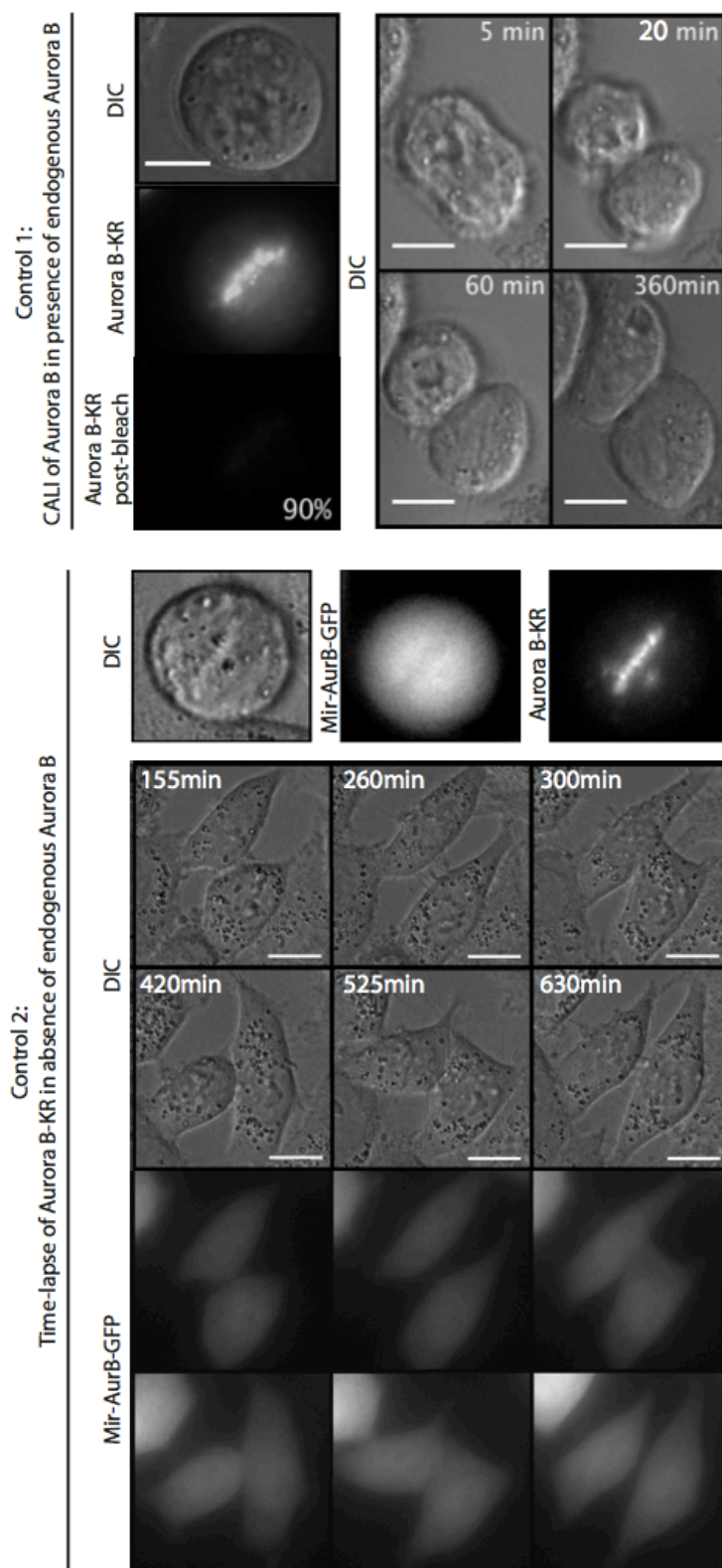


Figure S2.

Control panels show HeLa cells expressing Aurora B-KR. In the first panel the endogenous Aurora B is present. Time-Lapse shows time after irradiation. In the second panel, the endogenous Aurora B is shutdown by micro-RNA and the cell does not undergo irradiation. No mitotic defects are observed in both cases.

Chromophore assisted light inactivation of Aurora B in different phases of mitosis results in different phenotypes

The major phenotype observed in cells following CALI of Aurora B-KR was failure of cytokinesis due to the trapped chromatin bridges that led to cleavage furrow regression. This phenotype however masks the possible roles of Aurora B in central spindle organization, cleavage furrow constriction and/or cytokinesis. A spatial regulation of Aurora-B activity in cytokinesis was previously shown using fluorescence resonance energy transfer reporters for its activity (Fuller et al., 2008; Tan and Kapoor, 2011). To address the post metaphase roles of Aurora B we analyzed the resulting phenotypes of cells bleached in anaphase or after the intracellular bridge containing the midbody was visibly detected before abscission (Figure 3).

Upon photo-inactivation of Aurora B in anaphase, 60% of the cells failed in abscission during cytokinesis and become binucleates after correct furrow constriction and midbody formation (Figure 3A, and B, also Figure 1A, and B). Aurora B is known to regulate by phosphorylation components of the Centralspindlin complex, MKLP1 and MgcRacGAP, which are necessary for central spindle formation. The kinesin MKLP1 is thought to deliver (at the plus ends of the overlapping microtubules in the equatorial region of the dividing cells) the GTP activating protein MgcRacGAP where together with RhoGEF ECT2/LET-21/Pebble they are responsible for the regulation of Rho A activity (Glotzer, 2005; Minoshima et al., 2003; Yuce et al., 2005; D'Avino, 2009). A Rho A activity is necessary for the formation of the actinomyosin ring necessary for the ingression of the cleavage furrow. Therefore, failure of cytokinesis after CALI of Aurora B-KR during anaphase unequivocally demonstrates that the activity of Aurora B is needed for proper completion of cytokinesis. However, the suppression of Aurora B function in central spindle did not prevent or stop the formation and ingression of the cleavage furrow. And indeed in a recent phosphoproteomics approach it was shown that the best characterized myosin regulatory phosphorylation, Ser-19 on the regulatory light chain, was not affected following inhibition of Aurora B by VX680 (Ozlu et al., 2010). Therefore, the actin and myosin components of the contractile ring may not be affected by loss of Aurora B activity during late mitosis. One advanced hypothesis is that Aurora B can help the stabilisation of the central furrow by stabilising and concentrating centralspindlin and PCR1, a microtubule associating protein (Murata-Hori et al., 2002; Glotzer, 2009; Mollinari et al., 2005). And indeed, it has been shown that removal of 14-

3-3 by Aurora B causes centralspindlin to cluster, which in turn enables stable association with and bundling of microtubules at the spindle midzone (Douglas et al., 2010).

Strikingly, photo-inactivation of Aurora B at the midbody, following cleavage furrow constriction, had no visible effect on the completion of abscission (Figure 3A and 3C). This entails that under normal conditions, the activity of Aurora B is not essential for abscission which is the final step for cytodieresis. These findings are consistent with the proposed role of Aurora B in the abscission checkpoint which when activated allows the maintenance of actin patches that stabilise the midbody, inhibiting thus, abscission (Steigemann et al., 2009). The abscission checkpoint prevents cell tetraploidization by inhibiting cleavage furrow regression provoked by the presence of thin chromatin bridges. The abscission checkpoint in a cell without chromatin bridges is of no use and therefore CALI of Aurora B-KR may not have an impact on abscission. The abscission checkpoint might not be limited to chromatin bridge detection, since in the absence of the nucleoporin Nup 153 Aurora B stays active and localises to the midbody, ensuring a proper nuclear membrane reformation (Mackay et al., 2010). Furthermore, midbody resolution and abscission require certain elements of the endosomal sorting complex such as the ESCRT-III complex (Carlton et al., 2008). Consistent with the negative role of Aurora B activity in abscission is the recent observation showing that CHMP4C, a subunit of ESCRT-III when phosphorylated by Aurora B delays abscission (Carlton et al., 2012). Therefore, the lack of abscission defects following CALI of Aurora B-KR at late cytokinesis after midbody formation is consistent with the inhibitory role of Aurora B kinase for abscission. It would be interesting to test our model in conditions with a high percentage of cells with thin chromatin bridges. However, only a small percentage of cells have spontaneous chromatin bridges (Cimini et al., 2003), this occurrence increasing in transformed cells (Gisselsson et al., 2000). Given the fact our goal was to carry our studies under the least disturbing conditions it would have been very difficult to acquire statistically reliable data in support of our model.

Chromophore assisted light inactivation of Aurora B does not affect the other passenger protein dynamics

The proper localisation of the chromosomal passenger complex is essential for its functions throughout mitosis. We therefore investigated what is the status of the CPC after photo-inactivation of Aurora B, using GFP-tagged recombinant proteins. The results showed that the inner centromere localisation of either Survivin, or Borealin or Incenp was not disturbed after CALI of Aurora B in metaphase. Each member of the complex correctly transferred to the central spindle, and stayed on the residual midbody after furrow regression for a few hours (Figures 4A, and S4A). No delocalisation was observed when the cells failed to enter in anaphase and staying blocked in early mitotic stages (Figures 4B, S4B). The data suggest that Aurora B activity may not be required for the CPC localization in the inner centromeres and transfer of CPC from centromeres to the central spindle as well as its dynamic transport to the ends of the overlapping microtubules in the spindle zone and midbody accumulation.

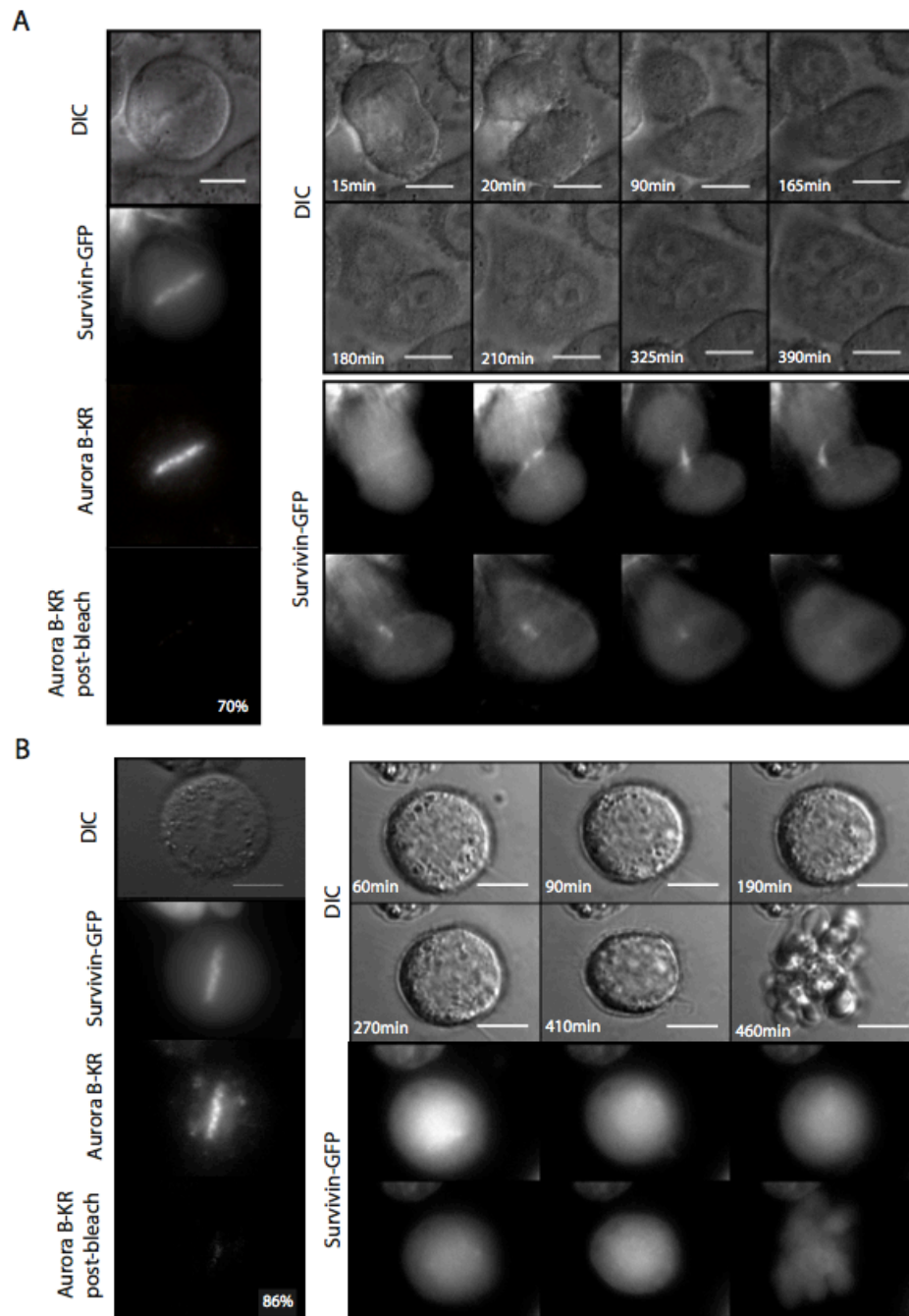


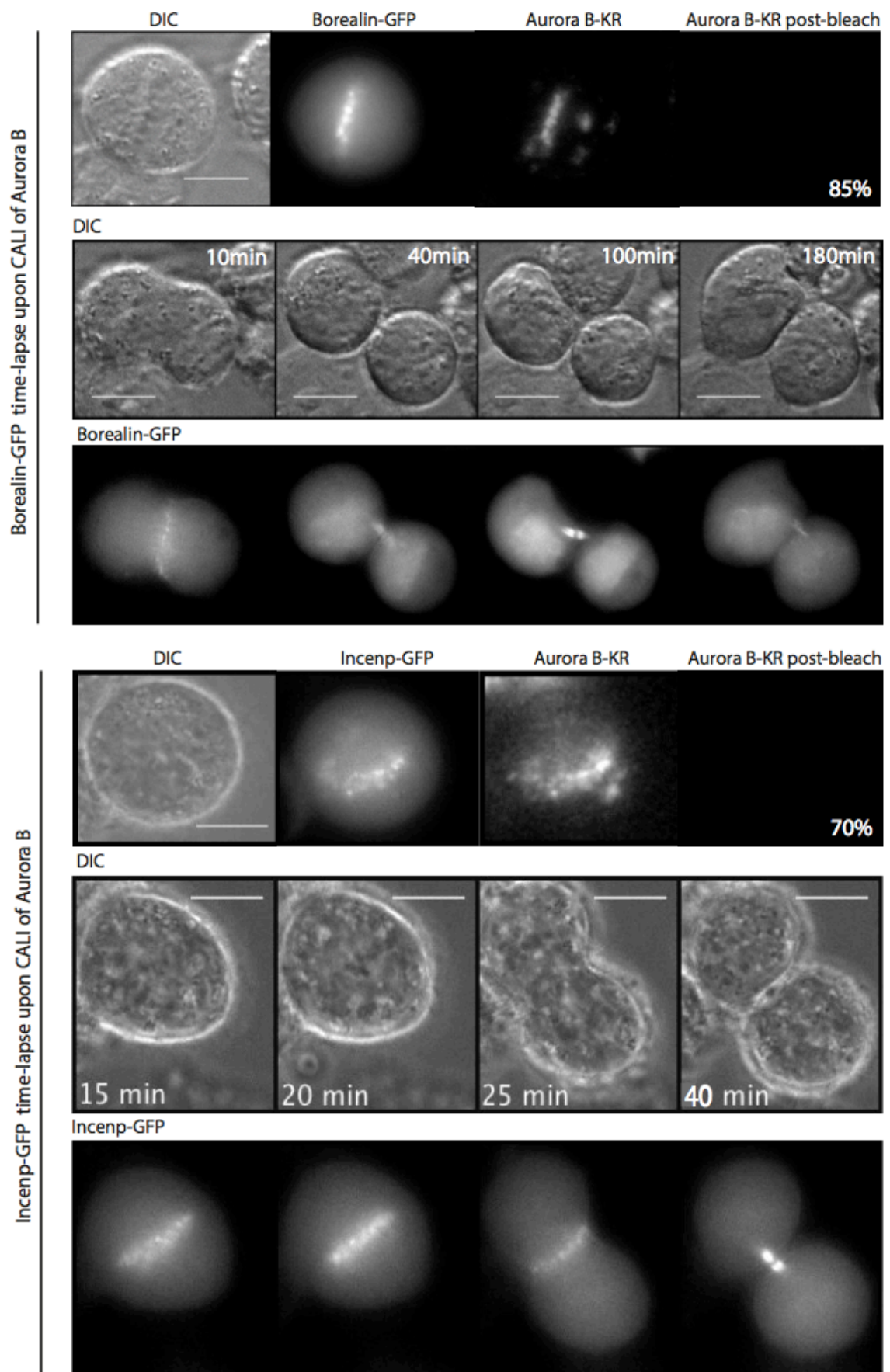
Figure 4. Undisturbed mitotic localisation of Survivin following CALI of Aurora B.

HeLa cells were co-transfected with Survivin-GFP and pBABE-Aurora B-KR and miRNA for depletion of the endogenous Aurora B. Images of cells after time-lapse observation of co-transfected cells after CALI in metaphase. The percentage of bleach of Aurora B-KR is represented on the pictures post-bleach.

(A) Left panel images of a cell seen by DIC, GFP, and KR channels as well as in the KR channel following bleaching. Right panels, time-lapse images of a cell following CALI by DIC and GFP channel. Survivin exhibited normal centromere localization, transferred to the central spindle and finally accumulated at the midbody after CALI of Aurora B before cleavage furrow regression and cytokinesis failure.

(B) Same as in **(A)**. CALI of Aurora B led to prolonged mitotic arrest and apoptosis. During the arrest Survivin retained its centromeric localization.

A



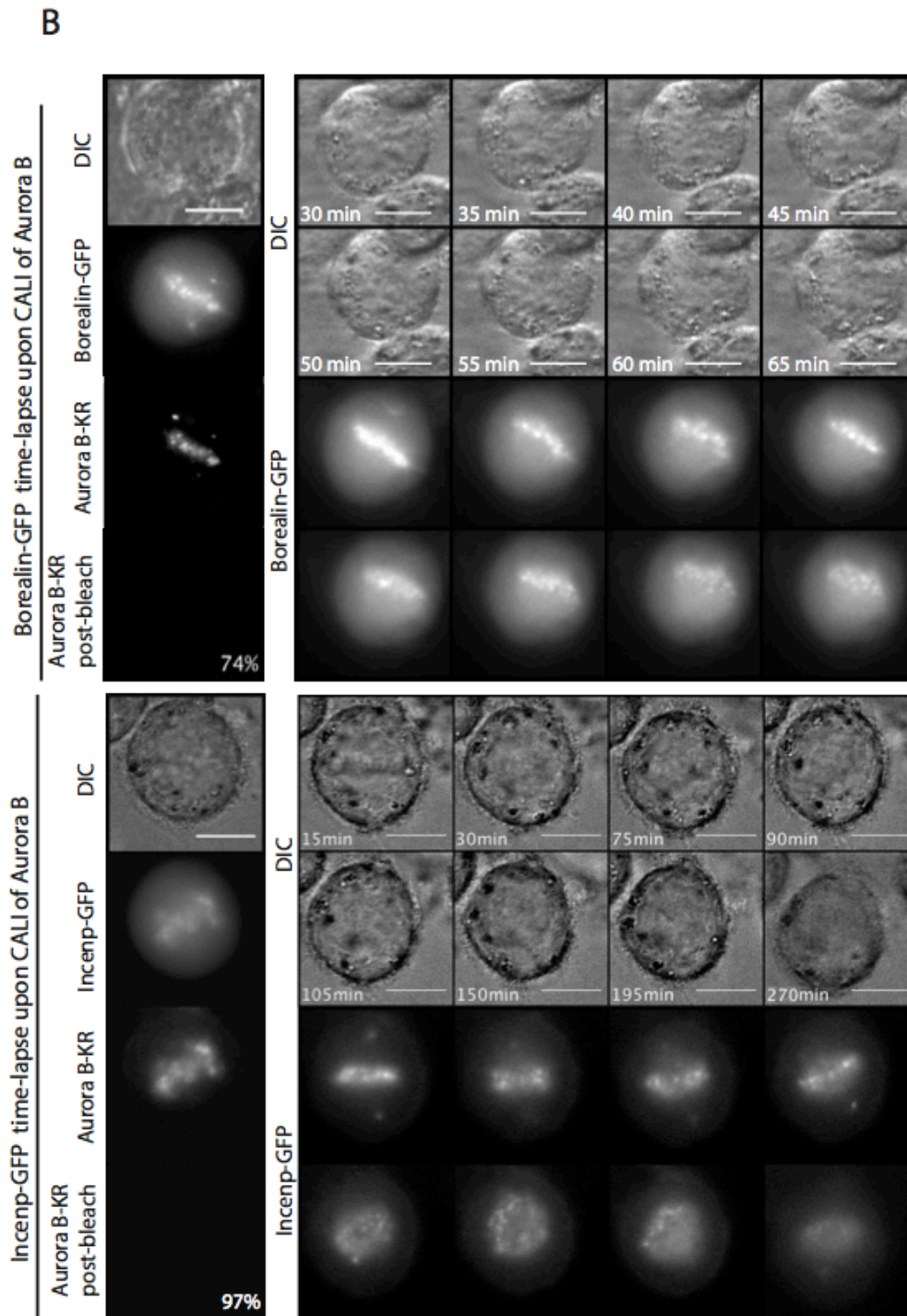


Figure S4.

Time-Lapse shows time after irradiation in prometaphase. The percentage of bleach of Aurora B-KR is represented on the pictures post-bleach. First panel shows HeLa cell expressing Borealin-GFP, second panel shows HeLa cell expressing GFP-Incenp. In both panel cells co-expressed Aurora B-KR with micro-RNA mediated ablation of the endogenous protein.

(A) Both Borealin-GFP and GFP-Incenp correctly relocate to the cleavage furrow and then found in the midbody in cytokinesis.

(B) No rapid delocalisation of both Borealin-GFP and GFP-Incenp is observed when the cells fail to enter in anaphase and stay blocked in early mitotic stages.

The mitotic localisation pattern of the passenger protein complex is not impaired by the expression of a dominant Aurora B dead kinase

The proper localization of the rest of CPC members after CALI of Aurora B-KR is reminiscent of the CPC behaviour in the presence of dominant negative Aurora B (K106A)(Scrittore et al., 2005). To confirm and extend the previous results, we explored the effect of a dominant Aurora B dead kinase on the passenger protein dynamics throughout mitosis. The mitotic localisation pattern of each GFP-tagged passenger protein is not affected by the dominant Aurora B dead kinase, which also shares the same localisation throughout mitosis. The same conclusions can be drawn: Aurora B activity is not involved in the passenger complex dynamic mechanisms during mitosis.

An interesting conclusion stemming from the above observation is that ROS formation after CALI affect only the activity of the Aurora B without leading to loss off the capability of Aurora B to be part of the CPC complex, that is, after CALI, the structural integrity of the CPC remains intact and only the kinase activity is lost. CALI inactivated Aurora B-KR behaves as the dominant negative Aurora B that retains its ability to participate in CPC formation, CPC recruitment to the inner centromeres and central spindle and midbody localization. The presented data are consistent with Aurora B having a structural role within the complex that is crucial for the CPC integrity since the use of RNAi against Aurora B abolishes the formation of the complex (Ruchaud et al., 2007). This gives clues concerning the state of Aurora B-KR after photobleaching. Indeed, to keep the complex together, the ROS mediated inactivation must be very local and the global structure of the protein is preserved.

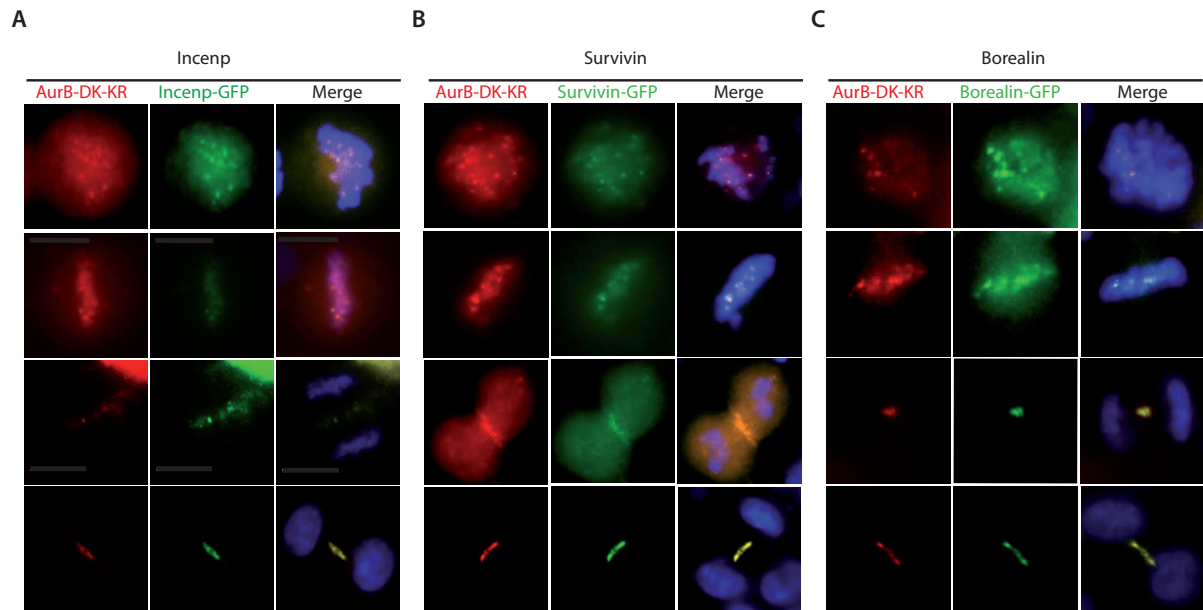


Figure 5. Undisturbed mitotic localisation pattern of members of the passenger protein in the presence of dominant Aurora B-KR dead kinase.

HeLa cells were co-transfected with Aurora B-KR-K106A dead kinase with micro-RNA for depletion of endogenous protein and with either Survivin-GFP **(A)** or Borealin-GFP **(B)** or GFP-Incenp **(C)**. Following transfection cells were fixed, permeabilized and stained for indirect immunofluorescence microscopic analysis. In all cases, Aurora B-KR-K106A dead kinase retained its colocalization with the different CPC partners, throughout the different stages of mitosis and cytokinesis, characteristic of passenger proteins.

Conclusion:

In this study we have employed CALI in order to study the function of Aurora B kinase during mitosis, with the main goal to circumvent the inherited temporal and specificity problems associated with the use of siRNA and/or inhibitors. The presented data confirm the major role of Aurora B during the various stages of mitosis. CALI inactivation of Aurora B in early mitosis leads to entry into anaphase with chromosome bridges indicating severe defects in the correction of erroneous kinetochore microtubule interactions and failure of the spindle assembly checkpoint to detect such errors. CALI inactivation of Aurora B at anaphase, after proper chromosome alignment leads to cytokinetic failure without inhibiting cleavage furrow ingression, underlying the important role of Aurora B activity for proper completion of cytokinesis. Most importantly, we were able to distinguish between, through CALI inactivation of Aurora B, the two distinct functions of the kinase in post-metaphase cells, the first being required in central spindle formation for completion of cytokinesis and the second being its negative inhibitory role of abscission. Lastly, the CALI system developed here was not only efficient in dissecting temporally the mitotic functions of Aurora B, but also in discriminating the enzymatic activity from the structural element role of Aurora B required for CPC assembly.

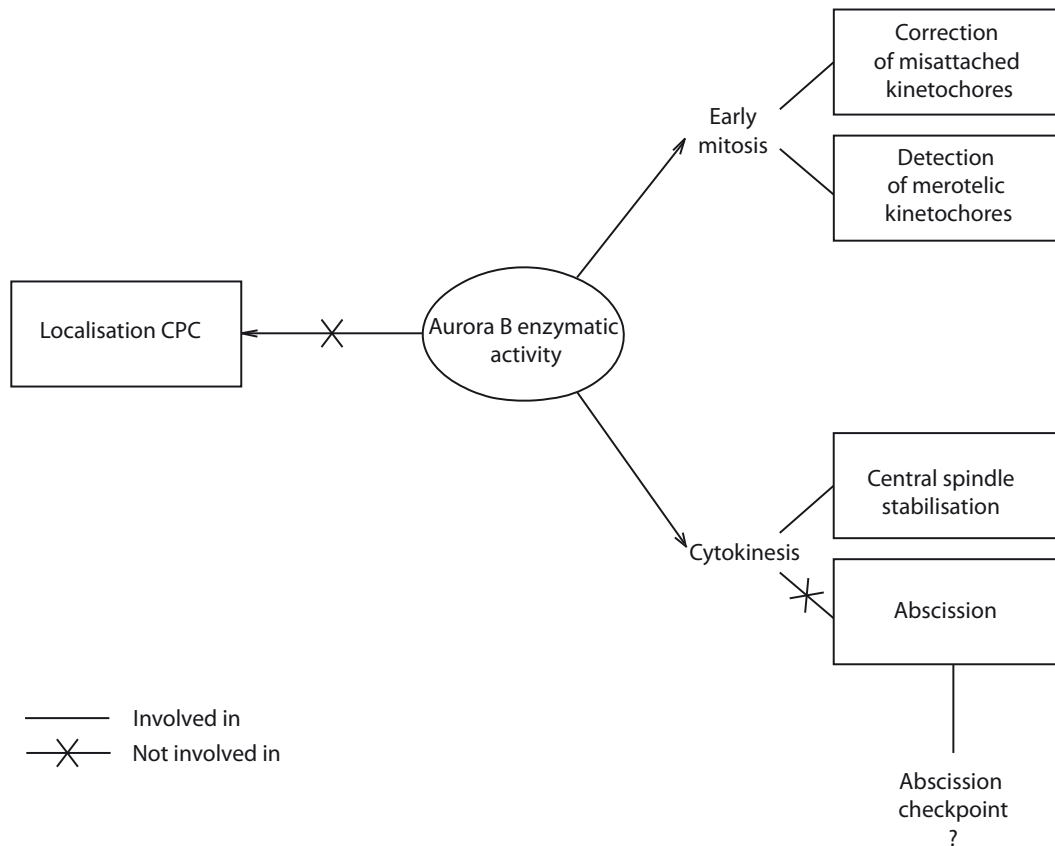


Figure 6. Dissecting the role of Aurora B's enzymatic activity from the CPC.

What mitotic processes are solely due to Aurora B's enzymatic activity? In early mitosis, Aurora B's activity is involved in the spindle assembly checkpoint. Two functions can be distinguished: the correction of microtubules/kinetochore attachment error, and the detection of merotelic kinetochores. During cytokinesis, Aurora B's activity is crucial for a viable furrow constriction, presumably by central spindle stabilisation (Glotzer, 2009). However, under normal conditions, Aurora B's activity is not essential for abscission. Throughout mitosis, Aurora B's activity is not involved in the dynamics of the chromosomal passenger complex.

Résultats Annexes

I. CALI à l'aide du laser 561nm

II. CALI sur des cellules enrichies en ponts chromatiniens

*En essayant continuellement
on finit par réussir.
Donc : plus ça rate,
plus on a de chances que ça marche.
Devise Shadok.*

I. CALI à l'aide du laser 561 nm.

Pour exploiter davantage la technologie CALI, et étudier spatio-temporellement les fonctions d'Aurora B, des expériences de photo-inactivation à l'aide d'un laser 561nm ont été conduites pour photo-inactiver Aurora B-Killer Red à un endroit choisi dans la cellule. Cela peut permettre une meilleure appréciation de la signalisation de la machinerie du point de contrôle mitotique, entre kinétochores.

Pour vérifier si l'on aboutit à la photo-inactivation d'Aurora B-Killer Red, l'intégralité de la cellule est exposée au laser. L'objectif est d'entièrement photo-blanchir Aurora B-Killer Red, tout comme pour les expériences de CALI à l'aide de la lampe HBO.

La cellule, représentée sur la Figure 1, a été photo-blanchie en cours de métaphase. Après photo-blanchiment d'Aurora B-Killer Red, la division semble se poursuivre correctement. Même plusieurs heures après, la cellule ne présente aucune régression du sillon de division. Pour environ 90 % des cellules suivies après photo-blanchiment d'Aurora B-Killer Red en début de mitose, aucun défaut mitotique n'est observés (n=20). La variation des conditions de photo-blanchiment n'a rien changé aux résultats obtenus (de 2 à 5% de puissance du laser, de 200 à 1000 itérations, de 1 à 10 coupes en Z). Killer Red ne semble donc pas émettre une quantité suffisante de ROS, après photo-blanchiment au laser 561nm, pour pouvoir photo-inactiver Aurora B.

Figure 1 : Photo-inactivation d'Aurora B à l'aide du laser. Le panel montre une série de clichés de time-lapse pris sur une cellule HeLa exprimant Aurora B-Killer Red, des micros ARN ciblant Aurora B et la GFP. La cellule a été photo-blanchie au cours de sa métaphase. Aucune anomalie de phénotype n'a pu être détectée au bout de plusieurs heures.



II. CALI sur des cellules enrichies en ponts chromatiniens.

Les résultats de photo-inactivation d'Aurora B en fin de cytokinèse ont montré qu'en présence de mitose normale, Aurora B n'est pas indispensable à l'étape d'abscission. Un rôle d'Aurora B dans le point de contrôle de l'abscission a été proposé. La kinase détecterait la présence de ponts chromatiniens ce qui, d'une part, retarderait l'abscission, et d'autre part, inhiberait la régression du sillon de division, phénomène observé en présence de ponts chromatiniens (Steigemann et al., 2009). Les ponts chromatiniens sont observés dans 5 à 10% des cellules HeLa. Dans le but d'étudier l'implication d'Aurora B dans des cytokinèses présentant de telles structures, les expériences de photo-inactivation ont été conduites en présence d'un tapis cellulaire enrichi en ponts chromatiniens (n=10). De faibles doses de nocodazole ont été mises en présence des cellules pour augmenter le nombre de chromosomes retardés aboutissant à la formation de ponts chromatiniens en cytokinèse. La Figure 2 montre la destinée d'une cellule photoblanchie en cytokinèse. La chromatine est visualisée par des histones H2B-GFP. Aucun pont chromatинien massif n'est observé et la cellule ne subit pas de régression du sillon de division. Cela peut indiquer que les doses de nocodazole utilisées sont trop faibles pour obtenir un enrichissement en ponts chromatiniens suffisant.

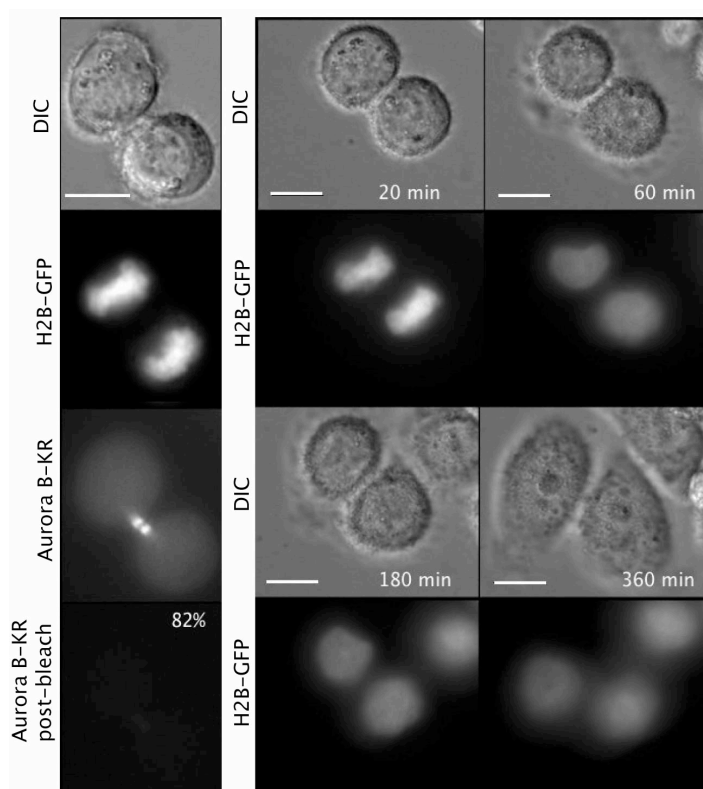


Figure 2 : Photo-inactivation d'Aurora B en cytokinèse en présence de faibles doses de nocodazole. Le panel montre une série de clichés de time-lapse pris sur une cellule HeLa H2B-GFP exprimant Aurora B-Killer Red et des microARN ciblant Aurora B. La cellule a été photoblanchie au cours de sa cytokinèse en présence de faibles doses de nocodazole. Aucune régression du sillon de division n'est observée au bout de plusieurs heures.

Chapitre IV : Discussion et perspectives

I. L'optogénétique développée pour l'étude d'Aurora B en mitose : une méthode fonctionnelle.

II. L'activité d'Aurora B est importante tout au long de la mitose.

- *Photo-inactivation d'Aurora B en début de mitose : mise en évidence des rôles de détection et correction des attachements non-amphitéliques.*
- *Photo-inactivation d'Aurora B en anaphase : l'activité de la kinase est importante pour une constriction viable du sillon de division.*
- *Photo-inactivation d'Aurora B en cytokinèse : Aurora B n'est pas requise pour l'abscission à l'issue d'une mitose correcte.*

III. L'activité d'Aurora B n'est pas impliquée dans la dynamique de localisation du CPC.

IV. Aurora B possède aussi un rôle structural au sein du CPC.

V. Réflexion sur l'Optogénétique.

- *Limites de la technologie : activité résiduelle d'Aurora B? Toxicité pour les cellules?*
- *Etat photo-inactivé d'Aurora B ?*
- *Photo-inactivation à l'aide du laser ?*

Perspectives

Conclusion

I. L'optogénétique développée pour l'étude d'Aurora B en mitose : une méthode fonctionnelle.

L'étude du complexe des protéines passagères est primordiale pour comprendre et lutter contre certains phénomènes de cancérisation. En effet, son rôle est prépondérant dans de nombreux processus mitotiques qui, dérégulés, peuvent aboutir à la tumorigénèse de la cellule. Néanmoins, la multitude et l'éphémérité des fonctions mitotiques que le CPC remplit, rendent difficile l'étude de chaque fonction spécifiquement. La technologie Killer Red, couplée à la pseudogénétique adaptée pour Aurora B, est une alternative à l'utilisation d'inhibiteurs peu spécifiques et à l'interférence ARN, approche trop globale. Les résultats sont en accord avec ceux obtenus à l'aide de ces techniques. La technologie Killer Red permet de photo-inactiver Aurora B à un instant choisi de la mitose, en un court laps de temps (40 à 60 secondes).

II. L'activité d'Aurora B est importante tout au long de la mitose.

Photo-inactivation d'Aurora B en début de mitose : mise en évidence des rôles de détection et correction des attachements non-amphitéliques.

Les résultats montrent l'issue de la mitose après photo-inactivation d'Aurora B déjà concentrée au niveau des centromères, c'est-à-dire de la fin de la prophase à la métaphase. Après photo-inactivation, la moitié des cellules poursuit la mitose jusqu'en cytokinèse, au cours de laquelle on observe la régression du sillon de division. Des chromosomes « retardés » sont observés en anaphase, aboutissant à la formation de ponts chromatiniens en cytokinèse. Leur présence est également observée en cas d'utilisation d'inhibiteurs d'Aurora B en début de mitose, ou d'interférence ARN (Cimini et al., 2006). La présence de ponts chromatiniens a été décrite comme provoquant la régression du sillon de division, ce qui résulte en la formation de cellules tétraploïdes.

Les chromosomes « retardés » sont caractéristiques d'un manque de réponse du point de contrôle du fuseau mitotique en métaphase. Ceux-ci résultent de kinétochores mérotéliques en métaphase, indiquant que le point de

contrôle échoue à détecter ce type d'attachement en absence d'Aurora B. C'est cohérent avec l'utilisation de faibles doses d'inhibiteurs ZM447439, pour laquelle 60% d'attachements mérotéliques sont observés dans des cellules Ptk1 (Cimini, 2007; Cimini et al., 2006). De la même façon, l'inhibition d'Aurora B à l'aide de l'Hesperadin provoque l'augmentation des kinétochores mérotéliques dans les cellules S3 (Knowlton et al., 2006). La détection par Aurora B de kinétochore mérotélique se fait sur la base de la tension intra et inter-kinétochorienne.

Une partie des cellules (10 %) vont rester bloquées en début de mitose sans se diviser pour éventuellement rentrer en apoptose. L'utilisation d'inhibiteurs d'Aurora B aboutit à la formation de micronuclei provenant de la reformation de la membrane nucléaire autour de l'amas de chromosomes tétraploïdes. Les cellules ne sont pas filmées pendant suffisamment longtemps, ou alors le DIC et le FITC ne sont pas appropriés à la visualisation d'un tel phénotype. Dans ce cas, il y a suffisamment de kinétochores incorrectement attachés pour activer le point de contrôle, même en absence d'une Aurora B active. Celui-ci va alors inhiber l'entrée en anaphase. L'absence de la kinase ne permet pas la correction des mauvais attachements par déstabilisation de ceux-ci.

L'activité enzymatique d'Aurora B en métaphase est responsable à la fois de la correction des erreurs d'attachements et de la détection des kinétochores mérotéliques.

Photo-inactivation d'Aurora B en anaphase : l'activité de la kinase est importante pour une constriction viable du sillon de division.

A l'issue de la photo-inactivation d'Aurora B en anaphase, 60% des cellules poursuivent la constriction du sillon de division jusqu'en cytokinèse, où on observe la régression du sillon de division. Aurora B est responsable de la localisation (Guse et al., 2005) et de l'activation du complexe Centralspindline (Glutzer, 2009), ce qui permet la régulation de la voie de signalisation RhoA. Elle-même impliquée dans l'assemblage et la constriction de l'anneau contractile d'actine-myosine (D'Avino, 2009; Yuce et al., 2005), également phosphorylé par

Aurora B (Ozlu et al., 2010). Cependant, l'abolition de l'activité d'Aurora B ne perturbe pas la formation et la constriction du sillon de division. En revanche, l'étape d'abscission en est affectée. Une hypothèse propose que le CPC permettrait la réorganisation des filaments de Septines, dont la polymérisation est contrôlée par phosphorylation chez la levure, ce qui faciliterait la constriction (Lewellyn et al., 2011). Or Un membre de la famille des Septines, Septine 9 serait impliqué dans l'abscission dans les cellules HeLa (Estey et al 2010). D'autre part, Aurora B participe à la stabilisation des éléments du fuseau central, en y concentrant les complexes Centralspindline et PCR1 (Douglas et al., 2010; Glotzer, 2009; Murata-Hori et al., 2002). Une désorganisation de ceux-ci pourrait perturber la formation du corps résiduel, ne permettant pas à l'abscission d'avoir lieu. En effet, MKLP1, membre du complexe Centralspindline, est essentiel pour la complétion de l'abscission (Guse et al., 2005; Zhu et al., 2005).

Photo-inactivation d'Aurora B en cytokinèse : Aurora B n'est pas requise pour l'abscission à l'issue d'une mitose correcte.

Après photo-inactivation d'Aurora B en cytokinèse, l'étape d'abscission ne semble pas affectée. Indiquant que, dans des conditions normales, Aurora B n'a pas de rôle prépondérant dans la cytokinèse. Cela est en accord avec le rôle proposé d'Aurora B dans le point de contrôle de l'abscission (Steigemann et al., 2009). Aurora B est supposée prévenir la formation de cellules tétraploïdes, suite à la régression du sillon de division provoquée par des ponts chromatinien. Aurora B permettrait d'une part, le maintien de patchs d'actine stabilisant le canal intercellulaire (Steigemann et al., 2009), et d'autre part, Aurora B inhiberait le complexe ESCRT-III, effecteur de l'abscission, en phosphorylant sa sous-unité CHMP4 (Carlton et al., 2012). Dans des cellules dépourvues de ponts chromatinien, un tel point de contrôle est satisfait et l'activité d'Aurora B non nécessaire. Uniquement 5 à 10% des cellules HeLa présentent des ponts chromatinien spontanés. L'absence de phénotype aberrant, après inactivation d'Aurora B en cytokinèse, est corrélée avec l'absence de ponts chromatinien. Cela suggère qu'Aurora B ne remplit pas d'autres fonctions importantes au cours de la cytokinèse. En outre, l'implication d'Aurora

B dans le point de contrôle mitotique ne semble pas limitée à la détection des ponts chromatinien. En effet, en absence de la Nucléoporine 53, composant des pores nucléaires, Aurora B reste active jusqu'à reformation correcte de la membrane nucléaire (Mackay et al., 2010).

Pour vérifier l'implication d'Aurora B dans ce point de contrôle, les expériences de photo-inactivation doivent être menées sur des cytokinèses présentant des ponts chromatinien. Pour cela, il est nécessaire de favoriser l'apparition de chromosomes retardés, aboutissant aux ponts chromatinien en cytokinèse. L'utilisation de nocodazole à faible dose, drogue dépolymérisante des microtubules, déstabilise légèrement le fuseau mitotique provoquant l'apparition de chromosomes retardés, sans pour autant déclencher le point de contrôle du fuseau. Dans les expériences préliminaires réalisées, aucune régression du fuseau n'est observée. Cependant l'utilisation de lignées H2B-GFP permet uniquement la détection de ponts chromatinien massifs ; cela est dû à la faible résolution obtenue en vidéomicroscopie. Il est probable que le dispositif expérimental ne soit pas correctement mis en place.

En outre, l'inactivation de la kinase n'empêche pas les autres membres du CPC d'exercer leur fonction mitotique. Ainsi Incenp est impliquée, entre autre, dans le recrutement de la kinésine MKLP1 au niveau du corps résiduel (Zhu et al., 2005).

III. L'activité d'Aurora B n'est pas impliquée dans la dynamique de localisation du CPC.

Après photo-inactivation d'Aurora B en début de mitose, les autres protéines passagères restent correctement localisées. De la même façon, l'expression d'une kinase Aurora B dominante négative ne perturbe pas la localisation des autres protéines passagères, ni d'elle-même, tout au long de la mitose. Cela indique à la fois que la localisation du complexe est maintenue après inactivation de la kinase, et que la dynamique de relocalisation, au niveau des centromères et sur le sillon de division, n'est pas perturbée. Aurora B n'est donc pas impliquée dans la dynamique du complexe : ni dans sa localisation ni dans sa maintenance au niveau des chromosomes ou du sillon de division.

De précédentes études montrent qu'en cas de surexpression excessive d'une kinase dominante négative, le CPC se reste en partie chargé le long des bras chromosomiques (Ditchfield et al., 2003; Honda et al., 2003). La saturation de la kinase elle-même au niveau des centromères peut expliquer un tel phénotype, aussi observé en cas de surexpression d'une Aurora B-GFP exogène. L'utilisation d'inhibiteurs tel que ZM447439 ne perturbe pas la localisation centromérique du CPC en prométaphase (Ditchfield et al., 2003). Cependant, une étude récente, utilisant une approche chimico-génétique pour inactiver Aurora B, montre que Survivine, et Aurora B elle-même, échouent à se concentrer au niveau des centromères en prométaphase, pour rester localisées le long des bras chromosomiques (Hengeveld et al., 2012). Néanmoins, en cas d'extinction d'Aurora B endogène par interférence ARN, un mutant Survivine, lié de façon covalente à Incenp, est correctement localisé au niveau des centromères (Vader et al., 2006). Cela suggère également que l'activité d'Aurora B n'est pas requise. Les autres protéines passagères sont-elles impliquées dans l'adressage du complexe ?

La partie N-terminale d'Incenp, domaine de liaison aux centromères (Ainsztein et al., 1998), Boréaline et Survivine sont suffisantes pour le recrutement centromérique du CPC (Vader et al., 2006). Un mutant Incenp-Survivine fusionné permet le recrutement du complexe au niveau des centromères en l'absence de Boréaline (Vader et al., 2006). Incenp interagit avec HP1, ceci pouvant expliquer comment le CPC est localisé au niveau de la chromatine en prophase (Ainsztein et al., 1998). Le domaine BIR de Survivine interagit avec H3T3 phosphorylé uniquement au niveau des centromères, par la kinase Haspin (Kelly et al., 2010; Wang et al., 2010; Yamagishi et al., 2010). De plus, la Shugoshin, récepteur centromérique du CPC (à travers sa liaison avec Survivine et/ou Boréaline), lie H2A T120 phosphorylée par la kinase mitotique BUB1 (Kawashima et al., 2010; Musacchio, 2010; Tsukahara et al., 2010; Yamagishi et al., 2010). En début d'anaphase, le complexe est relocalisé par MKLP2 (Gruneberg et al., 2004; Nakajima et al., 2011; Neef et al., 2003), cette relocalisation est dépendante de l'état déphosphorylé de la Thréonine 59 d'Incenp (Gruneberg et al., 2004; Vazquez-Novelle and Petronczki, 2010).

Cependant, l'existence d'un rétrocontrôle positif d'Aurora B sur sa propre localisation a récemment été proposé. En effet Aurora B phosphoryle la kinase Haspin, favorisant la phosphorylation de H3T3 (Wang et al., 2011). Un tel rétrocontrôle permettrait alors l'enrichissement d'Aurora B au niveau des centromères. Or un modèle propose que la kinase soit activée par la chromatine et les microtubules des attachements dépourvus de tension (Kelly and Funabiki, 2009). Un tel système favoriserait donc l'enrichissement d'Aurora B au niveau des centromères dont les kinétochores sont incorrectement attachés. On observe en effet l'enrichissement d'Aurora B au niveau des kinétochores mérotéliques (Knowlton et al., 2006).

IV. Aurora B possède aussi un rôle structural au sein du CPC.

Les résultats obtenus montrent que l'inactivation d'Aurora B n'empêche ni la formation ni la maintenance du complexe. Or la suppression d'Aurora B endogène par interférence ARN abolit la formation du complexe. Cela suggère qu'Aurora B possède un rôle structural permettant l'intégrité du complexe (Ruchaud et al., 2007). Chez *C-elegans*, la présence de l'homologue d'Aurora B, AIR-2, n'est pas requise pour la formation et la localisation du complexe. La taille plus courte de ICP-1, homologue d'Incenp, permet d'expliquer ce phénomène : chez les mammifères la grande taille d'Incenp déstabilise le complexe (Romano et al., 2003; Speliotes et al., 2000). De plus, après extinction par interférence ARN d'Aurora B, un mutant Incenp de 58 acides aminés est suffisant pour localiser Boréaline et Survivine au niveau des centromères (Klein et al., 2006). Cela suggère qu'Aurora B possède un rôle structural visant à stabiliser le complexe en présence d'Incenp de longueur complète.

V. Réflexion sur l'Optogénétique.

Limites de la technologie : activité résiduelle d'Aurora B? Toxicité pour les cellules?

Les différents phénotypes de mitoses aberrantes, observés après photo-inactivation, ne concernent pas la totalité de l'échantillon. Il est possible que la photo-inactivation de la kinase ne soit que partielle. De plus, l'expression de la protéine endogène est éteinte par interférence ARN. Or cette technologie ne permet pas l'extinction de 100% des protéines. On peut donc imaginer qu'une part de protéines endogènes est présente. En combinant photo-inactivation partielle et extinction par interférence ARN incomplète, on peut avoir une activité résiduelle d'Aurora B dans les cellules.

Par ailleurs, le protocole expérimental fait subir à la cellule un traitement présentant une certaine toxicité. 20% des cellules HeLa contrôles irradiées résultent en une mitose incorrecte, ce qui est supérieur aux 5 à 10% de défauts observés sur des lamelles de HeLa fixées en immunofluorescence. Les différents contrôles utilisés montrent néanmoins la grande spécificité de ce système.

L'utilisation du CALI nécessite de travailler sur des cellules vivantes, en vidéomicroscopie. Cela limite la résolution des images obtenues. De plus, l'étude des autres protéines est limitée à l'étude de leur localisation, il n'est par exemple pas possible de d'évaluer leurs état phosphorylés, comme c'est le cas en immunofluorescence.

Etat photo-inactivé d'Aurora B ?

Le complexe reste intact après photo-inactivation d'Aurora B. Cela apporte des informations sur l'état d'Aurora B-KR après irradiation de la partie Killer Red. En effet, pour préserver l'intégrité du complexe, la dégradation médiée par l'émission de ROS doit être très locale et la structure globale de la protéine préservée. La partie N-terminale de Killer Red est fusionnée à la partie C-terminale d'Aurora B. Le tunnel, au niveau duquel les molécules d'H₂O captent les espèces radicalaires de l'oxygène produisant du peroxyde d'hydrogène (Carpentier et al., 2009), débouche à proximité de l'extrémité N-terminale de

Killer Red. Le lobe C-terminal d'Aurora B est le siège de l'interaction avec les substrats (Sessa et al., 2005). On peut imaginer que les hélices α du lobe C sont directement touchées par les ROS émises du tunnel, perturbant probablement la liaison des substrats avec la kinase.

Photo-inactivation à l'aide du laser ?

A l'inverse des résultats obtenus en utilisant la lampe HBO, les expériences de photo-inactivation au laser 561nm n'ont pas abouti à un phénotype mitotique particulier. Il semble qu'un pré-blanchiment soit nécessaire à Killer Red, pour transiter sous une forme « killer green » qui serait responsable de l'émission de ROS (Carpentier et al., 2009). L'utilisation d'une lampe fluo, puis d'une bande passante, autorise une excitation du chromophore à plusieurs longueurs d'ondes, ce que le laser ne permet pas.

Perspectives

L'optogénétique, mise en place pour abolir l'activité kinasique d'Aurora B, a permis de dissocier celle-ci du rôle des autres protéines passagères du complexe. Pour étendre le décryptage des fonctions mitotiques de chacune des protéines passagères séparément, il pourrait être intéressant d'utiliser cette technologie pour les autres protéines. Celles-ci n'ont pas d'activité enzymatique mais possèdent des domaines structuraux importants dans l'activation et l'adressage du complexe, entre autres. Des travaux précédents ont montré la perte d'une fonction structurale suite à la photo-inactivation par Killer Red de la protéine de fusion. Ainsi la photo-inactivation de l'intégrine $\beta 1$ aboutit à la dissociation des invadosomes (Destaing et al., 2010), de même, la photo-inactivation du domaine PH (homologie à la pleckstrine) de la Phospholipase C $\delta 1$ provoque la délocalisation des membranes de la protéine recombinante (Bulina et al., 2006).

Pour déterminer la présence, suspectée, de sous-complexes du CPC variant au cours de la mitose, des expériences préliminaires de FRET entre Aurora B et ses partenaires, ont été conduites dans les différentes phases de la mitose, sans résultat actuellement. Pour compléter le décorticage mitotique du CPC, il serait intéressant de poursuivre ces expériences.

L'optogénétique permet l'étude des fonctions mitotiques d'Aurora B en cytokinèse. Cependant le protocole expérimental peut-être amélioré, en particulier pour l'étude de l'abscission. Il est difficile, sur un time-lapse comprenant des dizaines de positions, avec un tapis cellulaire assez confluent, d'évaluer le clivage des ponts intercellulaires. En revanche, sur des cellules exprimant la GFP, il est possible de photo-blanchir uniquement l'une des deux cellules. Un recouvrement de fluorescence, après blanchiment, indique alors qu'il y a communication entre les cellules, et que le canal intercellulaire est toujours présent.

En outre, le dispositif expérimental, visant à augmenter le nombre de cellules présentant des ponts chromatiniens, basé sur l'utilisation de faibles doses de nocodazole, peut être amélioré. De plus, il est envisageable d'augmenter la présence de chromosomes retardés, en outrepassant le point de contrôle

mitotique. Cela est possible en abolissant par interférence ARN l'une des protéines impliquée dans le point de contrôle.

Par ailleurs, une étude a récemment montré que l'utilisation d'interférence ARN dirigée contre la phosphatase OCRL provoque l'accumulation d'actine F au niveau du corps résiduel (Dambournet et al., 2011), formant une structure proche des patchs d'actine, observés en présence de ponts chromatinien. Il serait pertinent de voir l'effet de l'inactivation cytotinétique d'Aurora B sur le maintien de ces patchs, visualisables *ex vivo* par actine-GFP. Dans le même esprit, il est possible de visualiser l'impact de cette inactivation sur la localisation de CHMP4. Ces expériences complémentaires peuvent permettre d'élucider les voies de signalisation dans lesquelles Aurora B est mise en jeu au cours de l'abscission.

Conclusion

Les résultats obtenus confirment le rôle prépondérant d'Aurora B dans la régulation de la mitose. En début de mitose, son implication dans le point de contrôle du fuseau mitotique est mise en évidence ; en particulier dans la correction des attachements défectueux entre kinétochores et microtubules, et dans la détection des attachements mérotéliques, responsables des ponts chromatinien en cytokinèse. De plus, l'inactivation d'Aurora B après entrée en cytodiérèse montre que la kinase remplit deux rôles distincts en fin de mitose ; l'un dans l'achèvement de la cytokinèse, l'autre dans le point de contrôle de l'abscission.

En outre, la technologie CALI, couplée à la pseudogénétique, a permis d'étudier spécifiquement les fonctions mitotiques dues à l'activité kinase d'Aurora B seule, en la dissociant du rôle de ses partenaires et de son rôle structural au sein de complexe.

Annexe

Substrate	Organism	Phosphorylated residue	Cellular localization	Method
CAP-H	<i>H. sapiens</i>	S70	Chromosome arms	<i>In vivo</i>
Cnd2	<i>S. pombe</i>	S5 S41 S52	Chromosome arms	<i>In vivo</i>
Histone H1.4	<i>H. sapiens</i>	S27	Chromosome arms	<i>In vivo</i>
Histone H3	<i>H. sapiens</i>	S10 S28	Chromosome arms	<i>In vivo</i>
HMGN2	<i>H. sapiens</i>	S25 S29	Chromosome arms	<i>In vivo</i>
MYBBP1A	<i>H. sapiens</i>	S1303	Chromosome arms	<i>In vivo</i>
REC-8	<i>C. elegans</i>	T625	Chromosome arms	<i>In vitro</i>
AURKB	<i>H. sapiens</i>	T232	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
Borealin	<i>H. sapiens</i>	S154 S165 S219 T275 T278	Centromere/kinetochore	<i>In vitro</i>
CENP-A	<i>H. sapiens</i>	S7	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
CENP-E	<i>H. sapiens</i>	T422	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
CENP-U	<i>H. sapiens</i>	S349 S350	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
Dam1	<i>S. cerevisiae</i>	S20 S257 S265	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
DIA3	<i>H. sapiens</i>	T66 S196 S820 T882	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
DSN1/MIS13	<i>H. sapiens</i>	S100 S109	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
Haspin	<i>H. sapiens</i>	Multiple sites	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
INCENP	<i>H. sapiens</i>	T893 S894 S895	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
KIF2A	<i>X. laevis</i>	S132	Centromere/kinetochore	<i>In vitro</i>
KNL1/CASC5	<i>H. sapiens</i>	S24 S60	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
MCAK/KIF2C	<i>H. sapiens</i>	S95 S109 S111 S115 S192	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
MCAK/KIF2C	<i>X. laevis</i>	T95 S110 S196	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
MEI-S332/SGO1	<i>D. melanogaster</i>	S124 S125 S126	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
NDC80/HEC1	<i>H. sapiens</i>	S5 S15 S44 T49 S55 S69	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
PLK1	<i>D. melanogaster</i>	T182	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
SGO2	<i>H. sapiens</i>	Multiple sites T537	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
SKA1	<i>H. sapiens</i>	T157 S242	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
SKA3	<i>H. sapiens</i>	S87 S159	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
ZWINT-1	<i>H. sapiens</i>	S250 T251 S262	Centromere/kinetochore	<i>In vivo</i>
Bim1p (EB1)	<i>S. cerevisiae</i>	S139 S148 S149 S165 S166 S176	Spindle	<i>In vivo</i>
CKAP2/TMAP	<i>H. sapiens</i>	S627	Spindle/Chromosomes	<i>In vivo</i>
MKLP1 (isoform 1)	<i>H. sapiens</i>	S911	Spindle	<i>In vivo</i>
MKLP1 (isoform 2)	<i>H. sapiens</i>	S708	Spindle	<i>In vivo</i>
OP18/Stathmin	<i>X. laevis</i>	S16 S25 S39	Spindle	<i>In vitro</i>
CHMP4C	<i>H. sapiens</i>	S210	Midbody	<i>In vitro</i>
DESM	<i>H. sapiens</i>	S12 T17 S60	Midbody	<i>In vivo</i>
EB3	<i>H. sapiens</i>	S176	Midbody	<i>In vivo</i>
GFAP	<i>H. sapiens</i>	T7 S13 S38	Midbody	<i>In vitro</i>
RACGAP1	<i>H. sapiens</i>	S387	Midbody	<i>In vivo</i>
MRLC2	<i>H. sapiens</i>	S20	Midbody	<i>In vitro</i>
Nlp	<i>H. sapiens</i>	S185 S448 S585	Midbody	<i>In vivo</i>
RASSF1A	<i>H. sapiens</i>	T202 S203	Midzone/Midbody	<i>In vivo</i>
SEPT-1	<i>H. sapiens</i>	S248 S307 S315	Midbody	<i>In vitro</i>
Survivin	<i>H. sapiens</i>	T117	Midbody	<i>In vivo</i>
Vimentin	<i>H. sapiens</i>	Multiple sites S72	Midbody	<i>In vivo</i>
Katanin	<i>X. laevis</i>	S131	Spindle poles	<i>In vivo</i>
TLK-1	<i>C. elegans</i>	S634	Spindle poles	<i>In vivo</i>
ATM	<i>H. sapiens</i>	S1403	Multiple locations	<i>In vivo</i>
KIBRA	<i>H. sapiens</i>	S539	Other	<i>In vivo</i>
NSUN2	<i>H. sapiens</i>	S139	Other	<i>In vivo</i>
P53	<i>H. sapiens</i>	S183 S269 T284	Other	<i>In vivo</i>
Rb	<i>H. sapiens</i>	S780	Other	<i>In vivo</i>

Liste des substrats connus d'Aurora B : la colonne « Method » détaille si les sites de phosphorylations ont été identifiés « *In vivo* » : par spectrométrie de masse sur des extraits cellulaires, par des anticorps phospho-spécifiques (sites surlignés en gras), ou par des tests fonctionnels utilisant des mutants mimétiques ou non phosphorylables des substrats ; ou bien si ces sites ont été identifié « *In vitro* » : suite à des tests de phosphorylation avec une kinase Aurora B recombinante. (D'après Van der Waal et al., 2012).

- Adams, R.R., Tavares, A.A., Salzberg, A., Bellen, H.J., and Glover, D.M. (1998). pavarotti encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis. *Genes Dev* 12, 1483-1494.
- Ahonen, L.J., Kukkonen, A.M., Pouwels, J., Bolton, M.A., Jingle, C.D., Stukenberg, P.T., and Kallio, M.J. (2009). Perturbation of Incenp function impedes anaphase chromatid movements and chromosomal passenger protein flux at centromeres. *Chromosoma* 118, 71-84.
- Ainsztein, A.M., Kandels-Lewis, S.E., Mackay, A.M., and Earnshaw, W.C. (1998). INCENP centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1. *The Journal of cell biology* 143, 1763-1774.
- Andreassen, P.R., Palmer, D.K., Wener, M.H., and Margolis, R.L. (1991). Telophase disc: a new mammalian mitotic organelle that bisects telophase cells with a possible function in cytokinesis. *J Cell Sci* 99 (Pt 3), 523-534.
- Barr, F.A., and Gruneberg, U. (2007). Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell* 131, 847-860.
- Barr, F.A., Sillje, H.H., and Nigg, E.A. (2004). Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 429-440.
- Becker, M., Stolz, A., Ertych, N., and Bastians, H. (2010). Centromere localization of INCENP-Aurora B is sufficient to support spindle checkpoint function. *Cell Cycle* 9, 1360-1372.
- Bourhis, E., Hymowitz, S.G., and Cochran, A.G. (2007). The mitotic regulator Survivin binds as a monomer to its functional interactor Borealin. *J Biol Chem* 282, 35018-35023.
- Bulina, M.E., Chudakov, D.M., Britanova, O.V., Yanushevich, Y.G., Staroverov, D.B., Chepurnykh, T.V., Merzlyak, E.M., Shkrob, M.A., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2006a). A genetically encoded photosensitizer. *Nat Biotechnol* 24, 95-99.
- Bulina, M.E., Lukyanov, K.A., Britanova, O.V., Onichtchouk, D., Lukyanov, S., and Chudakov, D.M. (2006b). Chromophore-assisted light inactivation (CALI) using the phototoxic fluorescent protein KillerRed. *Nat Protoc* 1, 947-953.
- Cai, S., and Walczak, C.E. (2008). Kinetochore attachment: how the heck can a cell do it? *Curr Biol* 18, R1093-1096.
- Carlton, J.G., Agromayor, M., and Martin-Serrano, J. (2008). Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10541-10546.
- Carlton, J.G., Caballe, A., Agromayor, M., Kloc, M., and Martin-Serrano, J. (2012). ESCRT-III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C. *Science* 336, 220-225.

- Carpentier, P., Violot, S., Blanchoin, L., and Bourgeois, D. (2009). Structural basis for the phototoxicity of the fluorescent protein KillerRed. *FEBS Lett* 583, 2839-2842.
- Carvalho, A., Carmena, M., Sambade, C., Earnshaw, W.C., and Wheatley, S.P. (2003). Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J Cell Sci* 116, 2987-2998.
- Chen, C.T., and Doxsey, S. (2009). A last-minute rescue of trapped chromatin. *Cell* 136, 397-399.
- Chu, Y., Yao, P.Y., Wang, W., Wang, D., Wang, Z., Zhang, L., Huang, Y., Ke, Y., Ding, X., and Yao, X. (2011). Aurora B kinase activation requires survivin priming phosphorylation by PLK1. *J Mol Cell Biol* 3, 260-267.
- Ciferri, C., Pasqualato, S., Screpanti, E., Varetto, G., Santaguida, S., Dos Reis, G., Maiolica, A., Polka, J., De Luca, J.G., De Wulf, P., *et al.* (2008). Implications for kinetochore-microtubule attachment from the structure of an engineered Ndc80 complex. *Cell* 133, 427-439.
- Cimini, D. (2007). Detection and correction of merotelic kinetochore orientation by Aurora B and its partners. *Cell Cycle* 6, 1558-1564.
- Cimini, D., Mattiuzzo, M., Torosantucci, L., and Degrossi, F. (2003). Histone hyperacetylation in mitosis prevents sister chromatid separation and produces chromosome segregation defects. *Mol Biol Cell* 14, 3821-3833.
- Cimini, D., Wan, X., Hirel, C.B., and Salmon, E.D. (2006). Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Curr Biol* 16, 1711-1718.
- Conde e Silva, N., Black, B.E., Sivolob, A., Filipski, J., Cleveland, D.W., and Prunell, A. (2007). CENP-A-containing nucleosomes: easier disassembly versus exclusive centromeric localization. *J Mol Biol* 370, 555-573.
- Cooke, C.A., Heck, M.M., and Earnshaw, W.C. (1987). The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *The Journal of cell biology* 105, 2053-2067.
- Crosio, C., Fimia, G.M., Loury, R., Kimura, M., Okano, Y., Zhou, H., Sen, S., Allis, C.D., and Sassone-Corsi, P. (2002). Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol* 22, 874-885.
- Cutts, S.M., Fowler, K.J., Kile, B.T., Hii, L.L., O'Dowd, R.A., Hudson, D.F., Saffery, R., Kalitsis, P., Earle, E., and Choo, K.H. (1999). Defective chromosome segregation, microtubule bundling and nuclear bridging in inner centromere protein gene (Incenp)-disrupted mice. *Hum Mol Genet* 8, 1145-1155.
- D'Alise, A.M., Amabile, G., Iovino, M., Di Giorgio, F.P., Bartiromo, M., Sessa, F., Villa, F., Musacchio, A., and Cortese, R. (2008). Reversine, a novel Aurora kinases inhibitor,

inhibits colony formation of human acute myeloid leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 7, 1140-1149.

D'Avino, P.P. (2009). How to scaffold the contractile ring for a safe cytokinesis - lessons from Anillin-related proteins. *J Cell Sci* 122, 1071-1079.

Dambournet, D., Machicoane, M., Chesneau, L., Sachse, M., Rocancourt, M., El Marjou, A., Formstecher, E., Salomon, R., Goud, B., and Echard, A. (2011). Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nat Cell Biol* 13, 981-988.

Delacour-Larose, M., Molla, A., Skoufias, D.A., Margolis, R.L., and Dimitrov, S. (2004). Distinct dynamics of Aurora B and Survivin during mitosis. *Cell Cycle* 3, 1418-1426.

Delacour-Larose, M., Thi, M.N., Dimitrov, S., and Molla, A. (2007). Role of survivin phosphorylation by aurora B in mitosis. *Cell Cycle* 6, 1878-1885.

Destaing, O., Planus, E., Bouvard, D., Oddou, C., Badowski, C., Bossy, V., Raducanu, A., Fourcade, B., Albiges-Rizo, C., and Block, M.R. (2010). beta1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function. *Mol Biol Cell* 21, 4108-4119.

Ditchfield, C., Johnson, V.L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N., and Taylor, S.S. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *The Journal of cell biology* 161, 267-280.

Douglas, M.E., Davies, T., Joseph, N., and Mishima, M. (2010). Aurora B and 14-3-3 coordinately regulate clustering of centralspindlin during cytokinesis. *Curr Biol* 20, 927-933.

Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448-453.

Ferri, F., Bouzinba-Segard, H., Velasco, G., Hube, F., and Francastel, C. (2009). Non-coding murine centromeric transcripts associate with and potentiate Aurora B kinase. *Nucleic Acids Res* 37, 5071-5080.

Fu, J., Bian, M., Jiang, Q., and Zhang, C. (2007). Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 5, 1-10.

Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E.V., Bronson, R.T., and Pellman, D. (2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 437, 1043-1047.

Fuller, B.G., Lampson, M.A., Foley, E.A., Rosasco-Nitcher, S., Le, K.V., Tobelmann, P., Brautigan, D.L., Stukenberg, P.T., and Kapoor, T.M. (2008). Midzone activation of aurora B in anaphase produces an intracellular phosphorylation gradient. *Nature* 453, 1132-1136.

- Gadea, B.B., and Ruderman, J.V. (2006). Aurora B is required for mitotic chromatin-induced phosphorylation of Op18/Stathmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 4493-4498.
- Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A.J., Ruchaud, S., Hudson, D.F., Honda, R., Nigg, E.A., Gerloff, D.L., and Earnshaw, W.C. (2004). Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *The Journal of cell biology* *166*, 179-191.
- Giet, R., Petretti, C., and Prigent, C. (2005). Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol* *15*, 241-250.
- Girdler, F., Sessa, F., Patercoli, S., Villa, F., Musacchio, A., and Taylor, S. (2008). Molecular basis of drug resistance in aurora kinases. *Chem Biol* *15*, 552-562.
- Gisselsson, D., Pettersson, L., Hoglund, M., Heidenblad, M., Gorunova, L., Wiegant, J., Mertens, F., Dal Cin, P., Mitelman, F., and Mandahl, N. (2000). Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 5357-5362.
- Glotzer, M. (2005). The molecular requirements for cytokinesis. *Science* *307*, 1735-1739.
- Glotzer, M. (2009). The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 9-20.
- Goto, H., Yasui, Y., Kawajiri, A., Nigg, E.A., Terada, Y., Tatsuka, M., Nagata, K., and Inagaki, M. (2003). Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J Biol Chem* *278*, 8526-8530.
- Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E.A., and Inagaki, M. (2002). Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* *7*, 11-17.
- Greaves, I.K., Rangasamy, D., Ridgway, P., and Tremethick, D.J. (2007). H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 525-530.
- Gruneberg, U., Neef, R., Honda, R., Nigg, E.A., and Barr, F.A. (2004). Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *The Journal of cell biology* *166*, 167-172.
- Guse, A., Mishima, M., and Glotzer, M. (2005). Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis. *Curr Biol* *15*, 778-786.
- Hans, F., Skoufias, D.A., Dimitrov, S., and Margolis, R.L. (2009). Molecular distinctions between Aurora A and B: a single residue change transforms Aurora A into correctly localized and functional Aurora B. *Mol Biol Cell* *20*, 3491-3502.
- Harrington, E.A., Bebbington, D., Moore, J., Rasmussen, R.K., Ajose-Adeogun, A.O., Nakayama, T., Graham, J.A., Demur, C., Hercend, T., Diu-Hercend, A., *et al.* (2004). VX-680,

a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med* 10, 262-267.

Hauf, S., Cole, R.W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., van Meel, J., Rieder, C.L., and Peters, J.M. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *The Journal of cell biology* 161, 281-294.

Hengeveld, R.C., Hertz, N.T., Vromans, M.J., Zhang, C., Burlingame, A.L., Shokat, K.M., and Lens, S.M. (2012). Development of a chemical genetic approach for human Aurora B kinase identifies novel substrates of the chromosomal passenger complex. *Mol Cell Proteomics*.

Honda, R., Korner, R., and Nigg, E.A. (2003). Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell* 14, 3325-3341.

Houchmandzadeh, B., and Dimitrov, S. (1999). Elasticity measurements show the existence of thin rigid cores inside mitotic chromosomes. *The Journal of cell biology* 145, 215-223.

Hoyt, M.A., Totis, L., and Roberts, B.T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66, 507-517.

Hu, C.K., Coughlin, M., Field, C.M., and Mitchison, T.J. (2008). Cell polarization during monopolar cytokinesis. *The Journal of cell biology* 181, 195-202.

Jeyapragakash, A.A., Klein, U.R., Lindner, D., Ebert, J., Nigg, E.A., and Conti, E. (2007). Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell* 131, 271-285.

Kanda, A., Kawai, H., Suto, S., Kitajima, S., Sato, S., Takata, T., and Tatsuka, M. (2005). Aurora-B/AIM-1 kinase activity is involved in Ras-mediated cell transformation. *Oncogene* 24, 7266-7272.

Katayama, H., and Sen, S. (2010). Aurora kinase inhibitors as anticancer molecules. *Biochim Biophys Acta* 1799, 829-839.

Kawajiri, A., Yasui, Y., Goto, H., Tatsuka, M., Takahashi, M., Nagata, K., and Inagaki, M. (2003). Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinately with Rho-kinase. *Mol Biol Cell* 14, 1489-1500.

Kawashima, S.A., Yamagishi, Y., Honda, T., Ishiguro, K., and Watanabe, Y. (2010). Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science* 327, 172-177.

Keen, N., and Taylor, S. (2004). Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 4, 927-936.

- Kelly, A.E., and Funabiki, H. (2009). Correcting aberrant kinetochore microtubule attachments: an Aurora B-centric view. *Curr Opin Cell Biol* 21, 51-58.
- Kelly, A.E., Ghenoïu, C., Xue, J.Z., Zierhut, C., Kimura, H., and Funabiki, H. (2010). Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science* 330, 235-239.
- Kelly, A.E., Sampath, S.C., Maniar, T.A., Woo, E.M., Chait, B.T., and Funabiki, H. (2007). Chromosomal enrichment and activation of the aurora B pathway are coupled to spatially regulate spindle assembly. *Dev Cell* 12, 31-43.
- Khan, J., Ezan, F., Cremet, J.Y., Fautrel, A., Gilot, D., Lambert, M., Benaud, C., Troadec, M.B., and Prigent, C. (2011). Overexpression of active Aurora-C kinase results in cell transformation and tumour formation. *PLoS One* 6, e26512.
- Kinoshita, M., Field, C.M., Coughlin, M.L., Straight, A.F., and Mitchison, T.J. (2002). Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev Cell* 3, 791-802.
- Klein, U.R., Nigg, E.A., and Gruneberg, U. (2006). Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of Borealin, Survivin, and the N-terminal domain of INCENP. *Mol Biol Cell* 17, 2547-2558.
- Knowlton, A.L., Lan, W., and Stukenberg, P.T. (2006). Aurora B is enriched at merotelic attachment sites, where it regulates MCAK. *Curr Biol* 16, 1705-1710.
- Kollareddy, M., Dzubak, P., Zheleva, D., and Hajdich, M. (2008). Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 152, 27-33.
- Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Honda, S., Kobayashi, O., Hatakeyama, K., Ushio, Y., Saya, H., and Hirota, T. (2003). CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev Cell* 5, 853-864.
- Kwiatkowski, N., Deng, X., Wang, J., Tan, L., Villa, F., Santaguida, S., Huang, H.C., Mitchison, T., Musacchio, A., and Gray, N. (2012). Selective aurora kinase inhibitors identified using a taxol-induced checkpoint sensitivity screen. *ACS Chem Biol* 7, 185-196.
- Lan, W., Zhang, X., Kline-Smith, S.L., Rosasco, S.E., Barrett-Wilt, G.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Walczak, C.E., and Stukenberg, P.T. (2004). Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol* 14, 273-286.
- Lee, S.H., McCormick, F., and Saya, H. (2010). Mad2 inhibits the mitotic kinesin MKlp2. *The Journal of cell biology* 191, 1069-1077.
- Lens, S.M., Voest, E.E., and Medema, R.H. (2010). Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 825-841.

- Lewellyn, L., Carvalho, A., Desai, A., Maddox, A.S., and Oegema, K. (2011). The chromosomal passenger complex and centralspindlin independently contribute to contractile ring assembly. *The Journal of cell biology* *193*, 155-169.
- Li, R., and Murray, A.W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* *66*, 519-531.
- Li, S., Armstrong, C.M., Bertin, N., Ge, H., Milstein, S., Boxem, M., Vidalain, P.O., Han, J.D., Chesneau, A., Hao, T., *et al.* (2004). A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* *303*, 540-543.
- Li, X., and Nicklas, R.B. (1997). Tension-sensitive kinetochore phosphorylation and the chromosome distribution checkpoint in praying mantid spermatocytes. *J Cell Sci* *110* (Pt 5), 537-545.
- Liu, D., Vader, G., Vromans, M.J., Lampson, M.A., and Lens, S.M. (2009). Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science* *323*, 1350-1353.
- Liu, D., Vleugel, M., Backer, C.B., Hori, T., Fukagawa, T., Cheeseman, I.M., and Lampson, M.A. (2010). Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase. *The Journal of cell biology* *188*, 809-820.
- Lordier, L., Chang, Y., Jalil, A., Aurade, F., Garcon, L., Lecluse, Y., Larbret, F., Kawashima, T., Kitamura, T., Larghero, J., *et al.* (2010). Aurora B is dispensable for megakaryocyte polyploidization, but contributes to the endomitotic process. *Blood* *116*, 2345-2355.
- Luger, K., Rechsteiner, T.J., Flaus, A.J., Wayne, M.M., and Richmond, T.J. (1997). Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J Mol Biol* *272*, 301-311.
- Macara, I.G., Baldarelli, R., Field, C.M., Glotzer, M., Hayashi, Y., Hsu, S.C., Kennedy, M.B., Kinoshita, M., Longtine, M., Low, C., *et al.* (2002). Mammalian septins nomenclature. *Mol Biol Cell* *13*, 4111-4113.
- Mackay, A.M., Ainsztein, A.M., Eckley, D.M., and Earnshaw, W.C. (1998). A dominant mutant of inner centromere protein (INCENP), a chromosomal protein, disrupts prometaphase congression and cytokinesis. *The Journal of cell biology* *140*, 991-1002.
- Mackay, D.R., Makise, M., and Ullman, K.S. (2010). Defects in nuclear pore assembly lead to activation of an Aurora B-mediated abscission checkpoint. *The Journal of cell biology* *191*, 923-931.
- Malumbres, M. (2011). Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol Rev* *91*, 973-1007.
- Maresca, T.J. (2011). Cell division: aurora B illuminates a checkpoint pathway. *Curr Biol* *21*, R557-559.

- Mendoza, M., Norden, C., Durrer, K., Rauter, H., Uhlmann, F., and Barral, Y. (2009). A mechanism for chromosome segregation sensing by the NoCut checkpoint. *Nat Cell Biol* 11, 477-483.
- Merzlyak, E.M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M.E., Shcheglov, A.S., Fradkov, A.F., Gaintzeva, A., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S., Gadella, T.W., *et al.* (2007). Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat Methods* 4, 555-557.
- Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Tonozuka, Y., Kawajiri, A., Bao, Y.C., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W.S., Jr., *et al.* (2003). Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev Cell* 4, 549-560.
- Mollinari, C., Kleman, J.P., Saoudi, Y., Jablonski, S.A., Perard, J., Yen, T.J., and Margolis, R.L. (2005). Ablation of PRC1 by small interfering RNA demonstrates that cytokinetic abscission requires a central spindle bundle in mammalian cells, whereas completion of furrowing does not. *Mol Biol Cell* 16, 1043-1055.
- Mollinari, C., Reynaud, C., Martineau-Thuillier, S., Monier, S., Kieffer, S., Garin, J., Andreassen, P.R., Boulet, A., Goud, B., Kleman, J.P., *et al.* (2003). The mammalian passenger protein TD-60 is an RCC1 family member with an essential role in prometaphase to metaphase progression. *Dev Cell* 5, 295-307.
- Murata-Hori, M., Tatsuka, M., and Wang, Y.L. (2002). Probing the dynamics and functions of aurora B kinase in living cells during mitosis and cytokinesis. *Mol Biol Cell* 13, 1099-1108.
- Murata-Hori, M., and Wang, Y.L. (2002). The kinase activity of aurora B is required for kinetochore-microtubule interactions during mitosis. *Curr Biol* 12, 894-899.
- Musacchio, A. (2010a). Cell cycle: deconstructing tension. *Curr Biol* 20, R634-637.
- Musacchio, A. (2010b). Molecular biology. Surfing chromosomes (and Survivin). *Science* 330, 183-184.
- Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 379-393.
- Nakajima, Y., Cormier, A., Tyers, R.G., Pigula, A., Peng, Y., Drubin, D.G., and Barnes, G. (2011). Ipl1/Aurora-dependent phosphorylation of Sli15/INCENP regulates CPC-spindle interaction to ensure proper microtubule dynamics. *The Journal of cell biology* 194, 137-153.
- Neef, R., Preisinger, C., Sutcliffe, J., Kopajtich, R., Nigg, E.A., Mayer, T.U., and Barr, F.A. (2003). Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *The Journal of cell biology* 162, 863-875.
- Nezi, L., and Musacchio, A. (2009). Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 21, 785-795.

- Nicklas, R.B., and Koch, C.A. (1969). Chromosome micromanipulation. 3. Spindle fiber tension and the reorientation of mal-oriented chromosomes. *The Journal of cell biology* 43, 40-50.
- Norden, C., Mendoza, M., Dobbelaere, J., Kotwaliwale, C.V., Biggins, S., and Barral, Y. (2006). The NoCut pathway links completion of cytokinesis to spindle midzone function to prevent chromosome breakage. *Cell* 125, 85-98.
- Ota, T., Suto, S., Katayama, H., Han, Z.B., Suzuki, F., Maeda, M., Tanino, M., Terada, Y., and Tatsuka, M. (2002). Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res* 62, 5168-5177.
- Ozlu, N., Monigatti, F., Renard, B.Y., Field, C.M., Steen, H., Mitchison, T.J., and Steen, J.J. (2010). Binding partner switching on microtubules and aurora-B in the mitosis to cytokinesis transition. *Mol Cell Proteomics* 9, 336-350.
- Pavicic-Kaltenbrunner, V., Mishima, M., and Glotzer, M. (2007). Cooperative assembly of CYK-4/MgcRacGAP and ZEN-4/MKLP1 to form the centralspindlin complex. *Mol Biol Cell* 18, 4992-5003.
- Pereira, G., and Schiebel, E. (2003). Separase regulates INCENP-Aurora B anaphase spindle function through Cdc14. *Science* 302, 2120-2124.
- Petronczki, M., and Uhlmann, F. (2012). Cell biology. ESCRTing DNA at the cleavage site during cytokinesis. *Science* 336, 166-167.
- Petsalaki, E., Akoumianaki, T., Black, E.J., Gillespie, D.A., and Zachos, G. (2011). Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation. *The Journal of cell biology* 195, 449-466.
- Piekny, A.J., and Glotzer, M. (2008). Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis. *Curr Biol* 18, 30-36.
- Qi, G., Ogawa, I., Kudo, Y., Miyauchi, M., Siriwardena, B.S., Shimamoto, F., Tatsuka, M., and Takata, T. (2007). Aurora-B expression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer. *Virchows Arch* 450, 297-302.
- Robinson, D.N., and Cooley, L. (1996). Stable intercellular bridges in development: the cytoskeleton lining the tunnel. *Trends Cell Biol* 6, 474-479.
- Romano, A., Guse, A., Krascenicova, I., Schnabel, H., Schnabel, R., and Glotzer, M. (2003). CSC-1: a subunit of the Aurora B kinase complex that binds to the survivin-like protein BIR-1 and the incenp-like protein ICP-1. *The Journal of cell biology* 161, 229-236.
- Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2007). The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell* 131, 230-231.

Salaun, P., Rannou, Y., and Prigent, C. (2008). Cdk1, Plks, Auroras, and Neks: the mitotic bodyguards. *Adv Exp Med Biol* 617, 41-56.

Samoshkin, A., Arnaoutov, A., Jansen, L.E., Ouspenski, I., Dye, L., Karpova, T., McNally, J., Dasso, M., Cleveland, D.W., and Strunnikov, A. (2009). Human condensin function is essential for centromeric chromatin assembly and proper sister kinetochore orientation. *PLoS One* 4, e6831.

Scrittore, L., Skoufias, D.A., Hans, F., Gerson, V., Sassone-Corsi, P., Dimitrov, S., and Margolis, R.L. (2005). A small C-terminal sequence of Aurora B is responsible for localization and function. *Mol Biol Cell* 16, 292-305.

Sessa, F., Mapelli, M., Ciferri, C., Tarricone, C., Areces, L.B., Schneider, T.R., Stukenberg, P.T., and Musacchio, A. (2005). Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol Cell* 18, 379-391.

Skoufias, D.A., Indorato, R.L., Lacroix, F., Panopoulos, A., and Margolis, R.L. (2007). Mitosis persists in the absence of Cdk1 activity when proteolysis or protein phosphatase activity is suppressed. *The Journal of cell biology* 179, 671-685.

Smith, S.L., Bowers, N.L., Betticher, D.C., Gautschi, O., Ratschiller, D., Hoban, P.R., Booton, R., Santibanez-Koref, M.F., and Heighway, J. (2005). Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability. *Br J Cancer* 93, 719-729.

Sorrentino, R., Libertini, S., Pallante, P.L., Troncone, G., Palombini, L., Bavetsias, V., Spalletti-Cernia, D., Laccetti, P., Linardopoulos, S., Chieffi, P., *et al.* (2005). Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 928-935.

Speliotes, E.K., Uren, A., Vaux, D., and Horvitz, H.R. (2000). The survivin-like *C. elegans* BIR-1 protein acts with the Aurora-like kinase AIR-2 to affect chromosomes and the spindle midzone. *Mol Cell* 6, 211-223.

Steigemann, P., and Gerlich, D.W. (2009). An evolutionary conserved checkpoint controls abscission timing. *Cell Cycle* 8, 1814-1815.

Steigemann, P., Wurzenberger, C., Schmitz, M.H., Held, M., Guizetti, J., Maar, S., and Gerlich, D.W. (2009). Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell* 136, 473-484.

Sundin, L.J., and Deluca, J.G. (2010). Kinetochores: NDC80 toes the line. *Curr Biol* 20, R1083-1085.

Swedlow, J.R., and Hirano, T. (2003). The making of the mitotic chromosome: modern insights into classical questions. *Mol Cell* 11, 557-569.

Szafer-Glusman, E., Fuller, M.T., and Giansanti, M.G. (2011). Role of Survivin in cytokinesis revealed by a separation-of-function allele. *Mol Biol Cell* 22, 3779-3790.

Tachiwana, H., Kagawa, W., Shiga, T., Osakabe, A., Miya, Y., Saito, K., Hayashi-Takanaka, Y., Oda, T., Sato, M., Park, S.Y., *et al.* (2011). Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature* 476, 232-235.

Tan, L., and Kapoor, T.M. (2011). Examining the dynamics of chromosomal passenger complex (CPC)-dependent phosphorylation during cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16675-16680.

Tchatchou, S., Wirtenberger, M., Hemminki, K., Sutter, C., Meindl, A., Wappenschmidt, B., Kiechle, M., Bugert, P., Schmutzler, R.K., Bartram, C.R., *et al.* (2007). Aurora kinases A and B and familial breast cancer risk. *Cancer Lett* 247, 266-272.

Terada, Y. (2006). Aurora-B/AIM-1 regulates the dynamic behavior of HP1alpha at the G2-M transition. *Mol Biol Cell* 17, 3232-3241.

Torres, E.M., Williams, B.R., and Amon, A. (2008). Aneuploidy: cells losing their balance. *Genetics* 179, 737-746.

Tseng, B.S., Tan, L., Kapoor, T.M., and Funabiki, H. (2010). Dual detection of chromosomes and microtubules by the chromosomal passenger complex drives spindle assembly. *Dev Cell* 18, 903-912.

Tsukahara, T., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2010). Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature* 467, 719-723.

Uren, A.G., Wong, L., Pakusch, M., Fowler, K.J., Burrows, F.J., Vaux, D.L., and Choo, K.H. (2000). Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol* 10, 1319-1328.

Vader, G., Kauw, J.J., Medema, R.H., and Lens, S.M. (2006). Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody. *EMBO Rep* 7, 85-92.

van der Waal, M.S., Hengeveld, R.C., van der Horst, A., and Lens, S.M. (2012). Cell division control by the Chromosomal Passenger Complex. *Experimental cell research* 318, 1407-1420.

Vazquez-Novelle, M.D., Mirchenko, L., Uhlmann, F., and Petronczki, M. (2010). The 'anaphase problem': how to disable the mitotic checkpoint when sisters split. *Biochem Soc Trans* 38, 1660-1666.

Vazquez-Novelle, M.D., and Petronczki, M. (2010). Relocation of the chromosomal passenger complex prevents mitotic checkpoint engagement at anaphase. *Curr Biol* 20, 1402-1407.

Vong, Q.P., Cao, K., Li, H.Y., Iglesias, P.A., and Zheng, Y. (2005). Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin. *Science* 310, 1499-1504.

- Wang, F., Dai, J., Daum, J.R., Niedzialkowska, E., Banerjee, B., Stukenberg, P.T., Gorbsky, G.J., and Higgins, J.M. (2010). Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science* 330, 231-235.
- Wang, F., Ulyanova, N.P., van der Waal, M.S., Patnaik, D., Lens, S.M., and Higgins, J.M. (2011). A positive feedback loop involving Haspin and Aurora B promotes CPC accumulation at centromeres in mitosis. *Curr Biol* 21, 1061-1069.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A., and Allis, C.D. (1999). Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 97, 99-109.
- Westermann, S., Drubin, D.G., and Barnes, G. (2007). Structures and functions of yeast kinetochore complexes. *Annu Rev Biochem* 76, 563-591.
- Wurzenberger, C., and Gerlich, D.W. (2011). Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 469-482.
- Xu, Z., Vagnarelli, P., Ogawa, H., Samejima, K., and Earnshaw, W.C. (2010). Gradient of increasing Aurora B kinase activity is required for cells to execute mitosis. *J Biol Chem* 285, 40163-40170.
- Yamagishi, Y., Honda, T., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2010). Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science* 330, 239-243.
- Yang, Y., Wu, F., Ward, T., Yan, F., Wu, Q., Wang, Z., McGlothen, T., Peng, W., You, T., Sun, M., *et al.* (2008). Phosphorylation of HsMis13 by Aurora B kinase is essential for assembly of functional kinetochore. *J Biol Chem* 283, 26726-26736.
- Yuce, O., Piekny, A., and Glotzer, M. (2005). An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *The Journal of cell biology* 170, 571-582.
- Zeitlin, S.G., Shelby, R.D., and Sullivan, K.F. (2001). CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *The Journal of cell biology* 155, 1147-1157.
- Zhu, C., Bossy-Wetzel, E., and Jiang, W. (2005). Recruitment of MKLP1 to the spindle midzone/midbody by INCENP is essential for midbody formation and completion of cytokinesis in human cells. *Biochem J* 389, 373-381.